

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO QUÍMICA E BIOQUÍMICA



## **Desenvolvimento de novos polímeros biocompatíveis para utilização em ambiente aquático**

Ana Raquel Pinheiro Gonçalves

**Mestrado em Química Tecnológica**

Dissertação orientada por:  
Prof. Doutora Maria José Vitoriano Lourenço  
Professor Doutor João Carlos Moura Bordado

2019



## Resumo

Os plásticos, hoje em dia são um tópico com bastante interesse científico e social. Se por um lado é necessário encontrar alternativas de matérias primas para a sua produção, por outro lado são necessários investimentos para a investigação e enquadramento legal para o fabrico de polímeros compatíveis com o ambiente aquático. O ideal seria que estes novos polímeros servissem de alimento às espécies marinhas. Deste modo, sintetizou-se um polímero, o Poli(D,L – Lactídeo co – Glicolídeo) (PLGA) cujos monómeros são biodegradáveis, e que se degradam em compostos que estão presentes nos organismos vivos. A caracterização química e morfológica de uma espécie de medusa foi realizada, com o intuito de verificar se esta espécie apresentaria PLGA na sua constituição e se poderia ser utilizada como uma fonte natural de polímero biodegradável.

No estuário de Tejo está presente uma das mais importantes e grandes populações de Cnidários, *Catostylus tagi*. O corpo desta espécie de medusas possui cerca de 97% de água, são bastante frágeis e possuem menos de 5% de matéria orgânica sólida. As medusas não possuem cérebro, olhos, guelras ou coração. O seu corpo apresenta uma forma do tipo “sino” com simetria radial, constituído por duas camadas de células, e por uma coroa de tentáculos.

As medusas foram recolhidas em Maio e Junho de 2018, na região de São João da Talha. Depois de recolhidas, foram lavadas e liofilizadas, para a sua posterior caracterização, por FTIR-ATR, DSC, TGA e SEM. Nas *C.tagi* liofilizadas, o FTIR-ATR revelou os picos relevantes do colagénio, o maior componente da matriz química da qual estes animais são constituídos. As imagens de SEM revelaram na zona da mesogleia uma rede porosa composta por fibras de colagénio, permitindo que a maioria da água presente nestes animais seja considerada água livre.

O Poli(D,L- Lactídeo co-glicolídeo) (PLGA) é considerado um copolímero sintético biodegradável, usado em suturas cirúrgicas, descoberto nos anos 60. Este copolímero contém unidades alternadas de monómeros de glicolídeo e lactídeo. O PLGA é um poliéster hidrofóbico e instável em meios húmidos. Como é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), o interesse por este material tem vindo a crescer o longo dos últimos anos. Este polímero é considerado biodegradável, devido à sua baixa toxicidade e ao facto de ser facilmente degradado no ambiente.

O PLGA foi sintetizado por um processo conhecido e sempre na proporção 50:50 de glicolídeo e lactídeo, uma vez que segundo outros estudos foi considerada a proporção com menor tempo de degradação. De seguida procedeu-se à sua caracterização por FTIR-ATR, DSC, TGA e NMR. Em relação à síntese de PLGA, tanto a análise de FTIR-ATR, como a análise termogravimétrica (DSC e TGA), encontram-se de acordo com a literatura revelando que a síntese do polímero foi bem-sucedida, contudo a análise de NMR revelou a existência de dímero de lactídeo por reagir.

**Palavras-Chave:** Biopolímero, PLGA, *Catostylus tagi*



## Abstract

The production of novel plastics formulations, nowadays, are a topic with a lot of scientific and social interest. If on the one hand it is necessary to find alternatives of raw materials for their production, on the other hand investments are necessary for research and legal framework for the manufacture of polymers compatible with the aquatic environment. Ideally, these new polymers should serve as food for marine species. A polymer, Poly (D, L-Lactide co-glycolide) (PLGA) whose monomers are biodegradable, and which degrade in compounds that are present in living organisms, has been synthesized. The chemical and morphological characterization of a jellyfish species was carried out to verify if this species would have PLGA in its constitution and if it could be used as a natural source of biodegradable polymer.

In the Tagus estuary one of the most important and large populations of Cnidarians, *Catostylus tagi* can be found. The body of this species of jellyfish has about 97% water. These animals are quite fragile because they have less than 5% of solid organic matter. Jellyfish have no brain, eyes, gills or heart. Presenting basically a bell-shaped body with radial symmetry, they are composed by two layers of cells, and a crown of tentacles.

Jellyfish were collected in May and June 2018, in the region of São João da Talha. After being collected, they were washed and lyophilized, for their later characterization. In the lyophilized *C.tagi*, its FTIR-ATR revealed the relevant peaks of collagen, the largest component of these animals. SEM images revealed in the mesoglea zone a porous network composed of collagen fibers, allowing most of the water present in these animals to be considered free water.

Poly(D,L-Lactide co-glycolide) (PLGA) is considered a synthetic biodegradable copolymer, used in surgical sutures, discovered in the 1960s. This copolymer contains alternating units of glycolide and lactide monomers. The PLGA is a hydrophobic polyester and unstable in wet media, but is also approved by the Food and Drug Administration (FDA), hence its growing interest. This type of polymer is considered biodegradable because of its low toxicity and the fact that it is easily degraded in the environment.

PLGA was synthesized by a process described in the literature and always in the 50:50 ratio of glycolide and lactide, since this proportion was the one that presents the longest degradation. Afterwards, it was characterized by DSC, FTIR-ATR, TGA and NMR. Regarding PLGA synthesis, both FTIR-ATR and thermogravimetric analysis (DSC and TGA), agreed with the literature revealing that the polymer synthesis was successful, however the NMR analysis revealed the existence of unreacted lactide dimer.

**Key words:** Biopolymer, PLGA, *Catostylus tagi*



## Agradecimentos

*“Quando você quer alguma coisa, todo o Universo conspira para que você realize o seu desejo.”*

Paulo Coelho

A prova de que o Universo conspirou a meu favor é sem dúvida esta dissertação, que é o culminar de mais uma etapa importante na minha vida. Para a conclusão de mais um desejo meu, muitas foram as pessoas que contribuíram para que ele se realizasse, e por isso não posso deixar de lhes agradecer.

Desta forma, não posso deixar de agradecer à minha orientadora e Professora Maria José Lourenço pelo cuidado, disponibilidade, e principalmente pelo apoio, uma vez que o início do meu estágio de Mestrado não começou da melhor maneira.

Ao meu orientador Professor João Carlos Bordado, em primeiro lugar pela oportunidade para trabalhar no seu Laboratório do grupo CERENA e em segundo lugar pelo interesse e disponibilidade, necessárias à realização desta dissertação.

Ao Doutor Rui Galhano pela inesgotável paciência e apoio no decorrer da minha temporada no Técnico.

Ao Professor Leonel Gordo por toda a ajuda e disponibilidade tanto na recolha das medusas do mar, como sobre um tema totalmente desconhecido por mim, as *Catostylus tagi*.

À Doutora Carla Queirós e à Doutora Ana Cristino pela incassável ajuda, constante disponibilidade, apoio moral nesta jornada sinuosa, mas principalmente pelo companheirismo e amizade.

Aos Mestres Daniela Gaspar e Mário Vale pela ajuda na caracterização por DSC e TGA do “meu” polímero e das medusas.

À Doutora Andreia Valente pela disponibilidade tanto na realização da caracterização por NMR do polímero, como no seu tratamento de resultados.

Quero agradecer tanto aos meus colegas do Laboratório do Técnico como do Laboratório de Ciência e Engenharia de Fluídos, FCUL pelo acolhimento e boa disposição, demonstrados em ambos os laboratórios. Recordarei com saudade todas as conversas informais, todos os momentos de descontração e as partilhas tanto de experiências como de conhecimento.

Aos meus amigos, por me ouvirem desabafar sobre as dificuldades que uma dissertação de Mestrado implica, e por toda a amizade que sempre me demonstraram.

Ao João Bento pela paciência, companheirismo e amor que foram crescendo ao longo destes anos. Foste e sempre serás o meu porto seguro, e quem ao longo desta nossa jornada me trouxe lucidez e clareza para ultrapassar os obstáculos que foram aparecendo.

Por fim, mas não menos importante, aos meus pais, avós e irmã, quero agradecer pelo apoio que sempre me deram em todas as decisões do meu percurso até agora, quer tenham sido elas boas ou más, que nunca deixaram de acreditar em mim, mostrando-me isso todos os dias, e permitiram que eu concretizasse todos os meus sonhos e chegasse até aqui.

A todos o meu muito sincero Obrigada!

Março 2019

*Ana Raquel Gonçalves*



## Índice

Resumo.....	iii
Abstract .....	v
Agradecimentos .....	vii
Índice .....	ix
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Tabelas.....	xiii
Lista de Símbolos e Abreviaturas .....	xiv
1. Introdução .....	1
1.1. Plásticos.....	1
1.2. Bioplásticos .....	9
1.3. Medusa Catostylus tagi .....	13
Fisiologia.....	14
Ciclo de Vida .....	15
Locomoção .....	16
1.4. Poli(D,L- Lactídeo co-glicolídeo) – PLGA.....	17
Síntese: .....	17
Propriedades .....	19
Degradação .....	19
2. Parte Experimental .....	21
2.1 Método de preparação das Medusas .....	21
2.2 Síntese do Poli (D,L- Lactídeo – co - Glicolídeo) – PLGA.....	23
2.3 Técnicas usadas na caracterização dos polímeros e das medusas .....	24
I. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier - FTIR-ATR .....	24
II. Liofilização .....	26
III. Análise Termogravimétrica - TGA.....	27
IV. Calorimetria Diferencial de Varrimento - DSC .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>

V.	Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear - NMR .....	28
VI.	Microscopia Electrónica de Varrimento - SEM.....	29
3.	Discussão de Resultados .....	30
3.1	Análise dos resultados das medusas.....	30
3.1.1.	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier - FTIR-ATR .....	30
3.1.2.	Calorimetria – TGA/DSC .....	32
3.1.3.	Microscopia Electrónica de Varrimento - SEM.....	35
3.2.	Análise dos resultados do PLGA .....	38
3.2.1.	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier - FTIR-ATR .....	38
3.2.3.	Calorimetria – TGA/DSC .....	40
3.2.4.	Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear - NMR .....	43
4.	Conclusões.....	45
5.	Perspectivas de Trabalho Futuro.....	48
6.	Referências Bibliográficas .....	49
7.	Anexos.....	i
7.1.	Análise de Custos .....	i
7.2.	Espectros de DSC das sínteses de PLGA.....	i
7.3.	Espectros de TGA das sínteses de PLGA.....	iv
7.4.	Espectro de NMR da síntese nº7 de PLGA .....	vii

## Índice de Figuras

<i>Figura 1: História do plástico. Adaptada de [8]</i> .....	2
<i>Figura 2: Produção Mundial de plástico entre 1950-2012. adaptada de [8]</i> .....	4
<i>Figura 3: Simbologia associada à categorização de plásticos.</i> .....	6
<i>Figura 4: Plásticos na areia da praia.</i> .....	8
<i>Figura 5: Plástico numa tartaruga.</i> .....	8
<i>Figura 6: Baleia encontrada morta nas Filipinas, com 40kg de plástico no seu interior.</i> .....	8
<i>Figura 7: Esquema dos vários tipos de plásticos, análise da autora.</i> .....	10
<i>Figura 8: Imagem de C.tagi. Retirada de [42]</i> .....	13
<i>Figura 9: Fisiologia das medusas. Imagem adaptada de [43].</i> .....	14
<i>Figura 10: Ciclo de vida das medusas Scyphozoa. Imagem adaptada de [43].</i> .....	15
<i>Figura 11: Estruturas químicas dos dímeros e polímeros e reação de copolimerização do PLGA, adaptado de [49]</i> .....	18
<i>Figura 12: Localização de S. João da Talha</i> .....	21
<i>Figura 13: Medusas depois de Liofilizadas.</i> .....	22
<i>Figura 14: Equipamento de FTIR-ATR Spectrum Two UATR two, da Perkin Elmer.</i> .....	24
<i>Figura 15: Equipamento de Liofilização, Labtron</i> .....	26
<i>Figura 16: Diagrama de fase, representativo da fase de sublimação.</i> .....	26
<i>Figura 17: Equipamento TGA/DSC STA 7200, da Hitachi.</i> .....	27
<i>Figura 18: Aparelho de NMR Modelo Avance 400 spectrometer, Bruker.</i> .....	28
<i>Figura 19: Aparelho de SEM FEG-SEM JSM 700 1F, da JEOL.</i> .....	29
<i>Figura 20: Espectro de Infravermelho das medusas liofilizadas.</i> .....	30
<i>Figura 21: Espectro de DSC das medusas liofilizadas.</i> .....	32
<i>Figura 22: Espectro de TGA e DTG da amostra das medusas liofilizadas.</i> .....	33
<i>Figura 23: Imagem da superfície das medusas liofilizadas, com ampliação x200</i> .....	35

<i>Figura 24: Espectro de EDS, dos componentes principais da amostra das medusas liofilizadas.</i>	36
<i>Figura 25: Imagens da rede porosa das medusas liofilizadas, com ampliação a 1000x.</i>	37
<i>Figura 26: Espectros de FTIR-ATR das várias sínteses de PLGA.</i>	38
<i>Figura 27: Espectro FTIR-ATR da amostra PLGA 5.</i>	39
<i>Figura 28: Espectro de DSC da síntese 5 de PLGA.</i>	40
<i>Figura 29: Espectro de TGA e DTG da amostra 4 de PLGA.</i>	41
<i>Figura 30: Espectro de NMR da síntese 5 de PLGA.</i>	44

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Exemplos de plásticos Termoplásticos e Termofixos. ....	5
<i>Tabela 2: Características gerais do estuário do Tejo.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabela 3: Lista de reagentes utilizados na síntese do polímero.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabela 4: Representação dos picos observados no espectro de infravermelho das medusas liofilizadas.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 5: Propriedades térmicas da amostra de medusas liofilizadas, no TGA.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 6: Propriedades térmicas das várias sínteses de PLGA, no DSC. ....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 7: Propriedades térmicas das várias sínteses de PLGA, no TGA. ....</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 8: Valores teóricos e experimentais das sínteses 5 e 7 de PLGA. ....</i>	<i>43</i>

## Lista de Símbolos e Abreviaturas

PS, Poliestireno  
PVC, Poli(cloreto de vinilo)  
PMMA, Polimetil-metacrilato, ou acrílico  
PE, Polietileno  
ICI, Imperial Chemical Industries  
PET, Polietileno tereftalato  
PA, Poliamidas  
PC, Policarbonato  
PUR, Poliuretano  
HDPE, Polietileno de alta densidade  
LDPE, Polietileno de baixa densidade  
PP, Polipropileno  
PLA, Ácido Poliláctico  
PHA, Polihidroxialcanoatos  
TPS, Amido Termoplástico  
PHB, Polihidroxibutirato  
PLGA, Poli(D,L- Lactídeo co-glicolídeo)  
FDA, Food and Drug Administration  
*C.tagi*, *Catostylus tagi*  
FTIR-ATR, Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier  
TGA, Análise Termogravimétrica  
DSC, Calorimetria de Varrimento Diferencial  
NMR, Espectroscopia por ressonância magnética nuclear  
SEM, Microscopia Electrónica de Varrimento  
EDS, Espectroscopia de raios X por dispersão em energia  
 $T_g$ , Temperatura de Transição vítrea  
 $T_d$ , Temperatura de Degradação  
 $T_{onset}$ , Temperatura inicial de perda de massa  
 $T_{endset}$ , Temperatura final de perda de massa  
 $T_{deg.máx}$ , Temperatura de degradação máxima  
ML, Fração Molar do Lactídeo  
MG, Fração Molar do Glicolídeo  
PL, Pico de Integração do Lactídeo  
PG, Pico de Integração do Glicolídeo

## 1. Introdução

### 1.1. Plásticos

#### I. Evolução Histórica

Os plásticos são, hoje em dia, um tópico com bastante interesse científico e social. O termo plástico, é usado essencialmente para descrever uma elevada gama de materiais sintéticos ou semi-sintéticos que podem ser usados nas mais variadas aplicações.<sup>[1]</sup> A designação “plástico” é original do grego “plastikós”, que exprime a característica dos materiais quanto à sua mobilidade. A primeira referencia a este tipo de material foi à borracha coagulada. A borracha coagulada era um material bastante elástico e por isso não era possível moldá-la nem por moldagem nem por extrusão. Em 1820, Thomas Hancock, descobriu que se a borracha fosse altamente desbastada ou mastigada, ela tornar-se-ia plástica, e, portanto também possível de fluir. Hoje em dia sabe-se que isso acontece devido à grande redução do peso molecular no processo de trituração mecânica. Em 1839, o americano Charles Goodyear, descobriu que a borracha retinha a sua elasticidade quando aquecida com enxofre e também possuía maior resistência a solventes. A reação da borracha com o enxofre foi, posteriormente, designada por vulcanização por William Brockendon.

Mais tarde, Schonbein ao seguir o trabalho anterior de Pelouze, conseguiu estabelecer as condições necessárias para a nitrção controlada da celulose. O produto tornou-se interessante como um explosivo e para a produção de colódio (uma solução de mistura de éter e álcool).

Entre a década de 1930 e 1940 deu-se o desenvolvimento industrial de quatro dos principais termoplásticos que continuam presentemente a ser utilizados: o poliestireno (PS), o poli(cloreto de vinilo) (PVC), as poliolefinas (por exemplo o polietileno) e o PMMA (Polimetil-metacrilato, ou acrílico). Todos estes materiais podem ser considerados formalmente como derivados do etileno. O polietileno (PE) foi descoberto em 1933 por Fawcett e Gibson na *Imperial Chemical Industries* (ICI). É considerado um polímero simples, pois é obtido a partir da polimerização do etileno. Nesse mesmo ano, Crawford conseguiu desenvolver a primeira síntese comercial de PMMA. Na Alemanha, em 1937, o poliestireno foi produzido pela primeira vez na *I.G. a Farben*, através da polimerização do monómero de estireno. O PVC foi produzido comercialmente pela primeira vez em 1940.<sup>[2,3]</sup> Durante este mesmo período, o trabalho pioneiro de Wallace Carothers (*Du Pont*) resultou na obtenção de uma patente do nylon 66, uma fibra totalmente sintética, produzida a partir de poliamidas. O termo mais tarde adotado para a designação deste polímero foi poliamida.<sup>[2,4,5]</sup> Ao

longo dos anos, houve a continuação do aperfeiçoamento dos plásticos já existentes, tanto por meio de mudanças nos seus métodos de produção, mistura e copolimerização, como também pelo uso de aditivos, como por exemplo retardadores de chama.

Hoje em dia, os principais desenvolvimentos foram na área dos bioplásticos, devido às questões de saúde, segurança, sustentabilidade e reciclagem se terem tornado cada vez mais importantes na área de desenvolvimento da produção de plásticos.

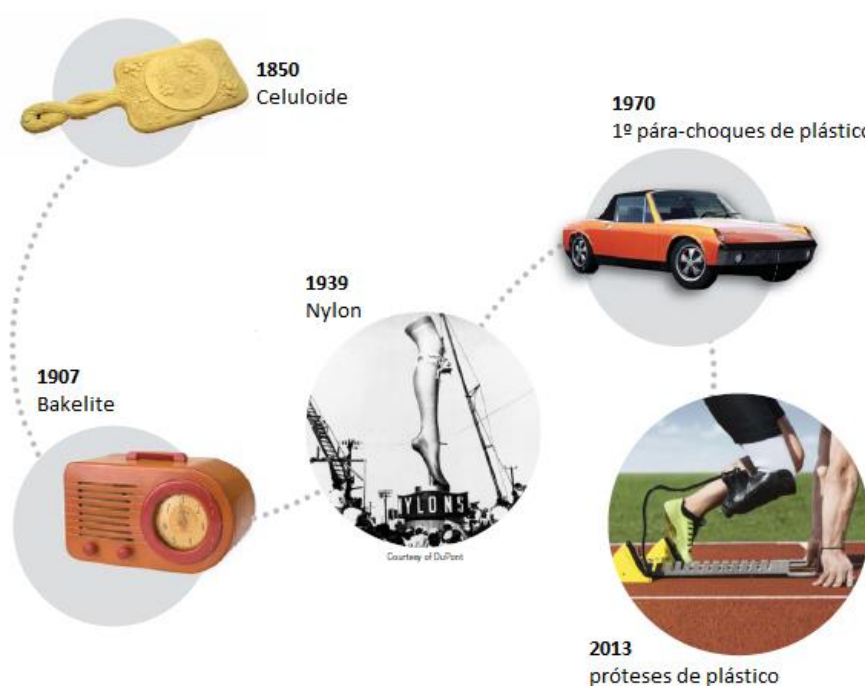


Figura 1: História do plástico. Adoptada de [8]

## II. Matérias-Primas

Antes da Segunda Guerra Mundial, a classe mais importante de termoplásticos, os celulósicos, eram produzidos recorrendo a fontes vegetais. A partir de resíduos de casca de aveia foi possível produzir plásticos de furano. O nylon, também foi desenvolvido a partir desta matéria-prima, visto que o furano apresentava uma estrutura muito semelhante ao benzeno, bastante utilizado na produção de nylon.

Na Europa, até meados da década de 50, a principal fonte de matéria-prima para a indústria dos plásticos era o carvão. Na destilação destrutiva, o carvão consegue



produzir quatro produtos: alcatrão de hulha, coque, gás e amoníaco proveniente do gás. O alcatrão de hulha era e continua a ser uma importante fonte de produtos químicos aromáticos, como o benzeno, tolueno, fenol, naftaleno e outros produtos relacionados. A partir desses produtos aromáticos é possível produzir outros produtos que levam à produção de polímeros importantes como resinas fenólicas, PS e os nylons. Outro exemplo é a reação de coque com óxido de cálcio que origina carboneto de cálcio, que em tratamento com água é capaz de produzir acetileno. Durante bastante tempo este foi um ponto de partida importante para a produção de acrilonitrilo, cloreto de vinilo, acetato de vinilo entre outros monómeros vinílicos.

Entre a década de 50 e 60, existiu uma mudança das fontes de carvão como matérias-primas para o petróleo, um produto mais barato.<sup>[2,6]</sup> Hoje em dia a indústria dos plásticos está fortemente integrada na indústria do petróleo. O crescimento da indústria petroquímica, foi um grande fator contributivo para o crescimento da indústria dos plásticos, onde é possível perceber um grande grau de interdependência entre elas.

Presentemente, o petróleo é a principal matéria-prima na indústria dos plásticos. O seu produto mais importante é o etileno, que é produzido por *steam cracking* obtendo-se assim vários hidrocarbonetos mais pequenos, como o etano, o propano, a nafta, o gasóleo atmosférico e o petróleo bruto.

Todavia, hoje em dia existe uma consciência global e generalizada de que os combustíveis fósseis como o petróleo e o carvão não são inesgotáveis nem regenerados a curto ou médio prazo, levando assim à necessidade da procura fontes renováveis de base biológica para muitos produtos industriais, incluindo os plásticos.  
[5,7]

### III. Produção

Devido à sua versatilidade e a sua alta eficiência de recursos, os plásticos tornaram-se materiais essenciais nos mais diversos setores, como por exemplo em embalagens, construção civil, transporte, energia renovável, dispositivos médicos ou até no desporto. No entanto é importante salientar que apenas entre 4 a 6% de todo o petróleo e gás utilizado na Europa é usado na produção de materiais de plástico.

A partir da Figura. 2 é possível perceber o crescimento da produção mundial e europeia dos plásticos desde 1950. Em 2016 foram produzidos cerca de 335 milhões de toneladas de plástico em todo o mundo. <sup>[8]</sup> Como é possível observar sempre existiu um crescimento gradual no consumo de plásticos ao longo dos anos, contudo em 2008 (devido à recessão mundial) houve um desaceleramento do crescimento da produção

mundial. Através de vários estudos realizados estima-se que em 2020 a produção mundial seja de cerca de 540 milhões de toneladas de plástico.<sup>[9]</sup>

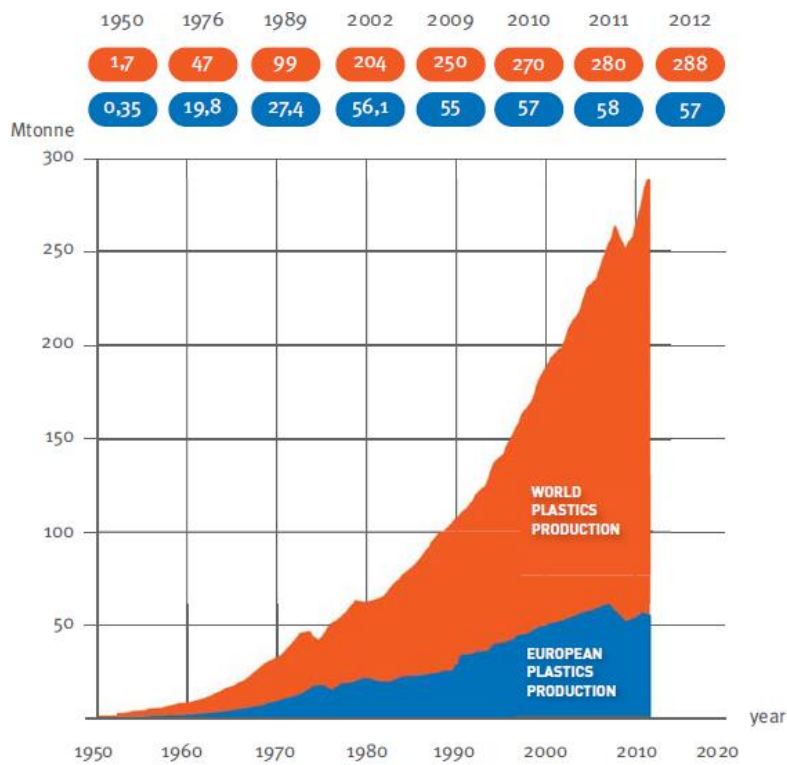


Figura 2: Produção Mundial de plástico entre 1950-2012, adoptada de [8]

#### IV. Tipos de Plásticos

Existem duas grandes categorias de plásticos, os **termoplásticos** e os **termoendurecidos** ou também denominados por **termofixos**. Dependendo da sua resposta ao calor, um determinado tipo de plástico classifica-se numa destas duas grandes categorias.

Os termoplásticos são caracterizados por possuir interações químicas fracas (van der Waals) entre as cadeias que assim podem ser facilmente rompidas com a introdução de energia. Dessa forma, quando tais materiais são aquecidos, as ligações de van der Waals são quebradas, permitindo que haja uma maior facilidade para a movimentação de cadeias poliméricas umas em relação às outras. A capacidade das cadeias fluírem com a aplicação de temperatura garante a esses materiais as suas características fundamentais de fácil re-processabilidade. Assim, os **termoplásticos**, acima da temperatura de transição vítrea, podem ser amolecidos e/ou derretidos quando é aplicado calor, permitindo assim a sua deformação a partir da aplicação de pressão, sem sofrer desagregação estrutural. Quando são arrefecidos, este tipo de plástico retoma a sua rigidez inicial. Devido a esta propriedade, os termoplásticos

podem ser moldados por injeção, extrudidos ou formados através de outras técnicas de moldagem.<sup>[10]</sup> Portanto, como podem ser manipulados através da aplicação de pressão e calor, isso permite que exista a possibilidade de estes serem reciclados e reaproveitados.

Os termoplásticos comerciais mais comuns são o poliestireno, as poliolefinas (por exemplo, polietileno e polipropileno), o nylon, o policloreto de vinil e polietileno tereftalato (PET). Estes plásticos são usados numa vasta gama de aplicações tais como filmes para embalagens, recipientes para bebidas e lixo, e uma grande variedade de peças e estofos.<sup>[11]</sup>

Ao contrário dos termoplásticos, os **termoendurecidos**, é um tipo de plástico cujas cadeias individuais foram quimicamente ligadas por ligações covalentes durante a polimerização ou por um tratamento químico ou térmico subsequente durante a sua produção.<sup>[12]</sup> Estes plásticos solidificam com a aplicação de calor, e não voltam ao estado amolecido inicial. Durante o re-aquecimento destes plásticos, as redes reticuladas resistem ao calor, e em vez de se dar o seu amolecimento, dá-se a sua degradação. Devido à sua resistência ao calor, a sua reciclagem é quase inexistente, uma vez que não podem ser refundidos e reutilizados após o seu arrefecimento.<sup>[5,11]</sup> Sendo assim, os materiais termoendurecidos são adequados para compostos, revestimentos e aplicações adesivas. Estes materiais são normalmente insolúveis, uma vez que a ligação cruzada origina um enorme aumento no peso molecular.

Os principais exemplos de plásticos termoendurecidos são as resinas epoxídicas, resinas de fenol-formaldeído e poliésteres insaturados.<sup>[6,11]</sup>

Tabela 1: Exemplos de plásticos Termoplásticos e Termofixos.

Termoplásticos	Termoendurecidos
Polietileno teraftalato (PET)	Poliuretano (PUR)
Polipropileno	Resinas epoxídicas
Poliestireno (PS)	Resinas acrílicas
Polietileno (PE)	Resinas fenólicas
Policloreto de vinil (PVC)	Poliéster insaturado
Poliamidas (PA)	Éster vinil
Policarbonato (PC)	Fenol-formaldeído
Etc	Etc

## V. Plásticos Mais Comuns

O plástico é um material que pode ter como matéria-prima fontes fósseis ou uma base biológica. Os plásticos são uma família de centenas de diferentes materiais com uma vasta variedade de propriedades que há mais de um século que acrescentam conforto ao quotidiano do Homem com a vantagem de terem um custo reduzido.

Os objetos em plástico para além de serem económicos, podem ser resistentes, rijos ou flexível, opacos ou transparentes, e podem ser utilizados numa vasta gama de temperaturas, contudo, a maioria é usado para um consumo descartável ou curto. De um modo geral qualquer plástico tradicional tem um tempo de vida bastante longo, contrariando o tempo de vida útil destes produtos, que normalmente é curto ou muito curto, contribuindo assim para o aumento de lixo nos ecossistemas.

Como a família dos plásticos é bastante vasta, em 1988, a *Society of the Plastics Industry* criou um sistema de classificação de plásticos para consumo humano que se divide em sete categorias e os respetivos pictogramas (Figura. 3).

- 1- Polietileno teraftalato, PET
- 2- Polietileno de alta densidade, HDPE
- 3- Policloreto de vinilo, PVC
- 4- Polietileno de baixa densidade, LDPE
- 5- Polipropileno, PP
- 6- Poliestireno, PS
- 7- OUTROS- Restantes plásticos.



Figura 3: Simbologia associada à categorização de plásticos.

## VI. Plásticos: Alguns problemas

Hoje em dia, um mundo sem plástico parece impossível. Os plásticos são uma parte indispensável nas nossas vidas, pois tem uma infinidade de aplicações. Embora os primeiros plásticos sintéticos tenham surgido no início do século XX, no entanto os primeiros plásticos surgiram muito antes e eram materiais bio-derivados por exemplo, da casca de ovo ou do sangue, que são polímeros orgânicos. A produção e utilização dos plásticos sintéticos em grande escala e fora do uso militar, só ocorreu depois da Segunda Guerra Mundial. A maioria dos polímeros utilizados na produção dos plásticos convencionais, como o etileno e o propileno, são derivados de hidrocarbonetos fósseis, por isso nenhum dos plásticos comuns é biodegradável. A sua facilidade de produção e manipulação, o seu baixo custo e as propriedades físicas e químicas, levaram a um aumento exponencial do consumo destes polímeros em todo o mundo. Este facto é evidenciado no facto de a produção global de plásticos no ano de 201 ter sido de 359 milhões de toneladas, enquanto que no século XX era produzido cerca de 2 milhões de toneladas.<sup>[13]</sup> Em contrapartida, os plásticos biodegradáveis correntemente têm uma produção de apenas 4 milhões de toneladas a nível mundial.<sup>[14]</sup>

Segundo a *Plastics Europe*, a Ásia detêm a maior percentagem de produção de plásticos no ano de 2017 (50,1%), sendo que só a China produz 29,4% do total de plásticos.<sup>[14]</sup> A maioria dos plásticos produzidos são utilizados para embalamento, logo esses mesmos plásticos deixam de ter utilização no ano em que são produzidos. Como resultado, existe uma acumulação destes materiais, uma vez que não se vão decompor por não serem biodegradáveis. Como consequência desta acumulação, e devido à dificuldade de eliminação, que só é possível por tratamento térmico destrutivo tais como a combustão, pirólise ou pela reciclagem, os plásticos acabam por ficar depositados em aterros ou no meio ambiente. Por isso os resíduos plásticos são uma crescente preocupação na sociedade, devido à poluição que eles provocam, quer pelo seu meio de eliminação quer pelo modo como são abandonados no meio ambiente.

A maioria dos plásticos que deixam de ter vida útil são abandonados e têm como principal destino final os mares e oceanos nas zonas sem recolha selectiva, como por exemplo nas Filipinas. Estima-se que anualmente, seja depositado no ambiente marinho entre 4,8 - 12,7 milhões de toneladas de plástico.<sup>[15]</sup> Nestes locais é possível encontrar resíduos de grandes dimensões como é o caso das redes e outros materiais derivados da pesca, designados macroplásticos, mas também se encontram resíduos de pequenas dimensões, denominados de microplásticos, que incluem partículas com dimensões inferiores a 5 mm.<sup>[16]</sup> Os microplásticos podem ainda dividir-se em duas outras categorias: os primários, em que a sua dimensão reduzida tem origem no processo de fabrico, por exemplo os pellets<sup>[17]</sup> ou as esferas plásticas dos cremes exfoliantes, e os secundários que derivam de plásticos de maiores dimensões, mas que por fotodegradação e abrasão mecânica, como a fratura e o estilhaçamento perdem a

sua integridade física. Os plásticos mais abundantes encontrados nestes ambientes são, o polipropileno, o polietileno, o policloreto de vinilo e o polistireno.<sup>[13]</sup>

Devido ao seu reduzido tamanho, os microplásticos apresentam um problema universal, devido à dificuldade na sua recolha e identificação. Estes materiais depositam-se no leito marinho, ficam suspensos na coluna de água e podem ainda ser ingeridos por seres vivos, uma vez que o seu tamanho se sobrepõem à faixa de tamanho das suas presas.<sup>[18]</sup> Este último facto é bastante preocupante, pois pode ocorrer a transferência destas partículas plásticas do sistema digestivo para o circulatório, existindo assim a possibilidade de danificar órgãos importantes como o coração e o fígado. A ingestão de microplásticos foi relatada em muitas espécies marinhas com diferentes unidades taxonómicas, incluindo cetáceos<sup>[17,19]</sup>, aves marinhas<sup>[20]</sup>, moluscos<sup>[21]</sup>, equinodermes<sup>[22]</sup>, zooplâncton<sup>[23]</sup> e corais.<sup>[24]</sup>

Por todas estas razões, a problemática dos microplásticos, da poluição destes materiais é cada vez mais preocupante devido às suas consequências, e por isso é cada vez mais essencial a sociedade tomar consciência destes problemas e tentar encontrar uma solução, nas zonas do globo mais afectadas.



*Figura 5: Plástico numa tartaruga.*



*Figura 4: Plásticos na areia da praia.*



*Figura 6: Baleia encontrada morta nas Filipinas, com 40kg de plástico no seu interior.*

## 1.2. *Bioplásticos*

Hoje em dia os plásticos convencionais de base petroquímica como por exemplo, o polietileno, polipropileno e o polietileno teraftalato constituem mais de 95% do mercado dos plásticos. Devido à degradação ambiental causada por este tipo de materiais e ao esgotamento dos recursos dos combustíveis fósseis, o interesse nos bioplásticos por consequência tem vindo a aumentar.

Os **bioplásticos** foram introduzidos de forma a reduzir o uso de plásticos derivados do petróleo, na década de 1980, uma vez que estes possuem uma série de vantagens, incluindo alta eficiência de recursos, redução da emissão de carbono e emissões de gases de efeito de estufa e economia dos recursos fósseis.<sup>[25]</sup>

Por causa da exigência do aumento de uma bio-economia sustentável, a capacidade de produção dos bioplásticos tem vindo a crescer desde 1,5 milhões de toneladas em 2012 para 1,9 milhões de toneladas em 2015 e prevê-se que em 2018 atinga os 6,7 milhões de toneladas, segundo a organização *European Bioplastics*.<sup>[25]</sup> Apesar de em comparação com a produção dos plásticos convencionais, os bioplásticos correspondem a menos de 5% do mercado global atual, por causa das suas limitações em termos das propriedades mecânicas e ao elevado custo elevado de produção.<sup>[26,27]</sup>

Os bioplásticos correspondem a todos os plásticos que derivam de fontes de origem biológica ou não, mas que possuam a capacidade de se biodegradarem. Um bioplástico pode ser total ou parcialmente derivado da biomassa. A biomassa usada para este tipo de materiais pode ser, derivada do milho, da cana-de-açúcar ou da celulose.<sup>[28]</sup>

O termo bioplástico é bastante abrangente, por isso é necessário perceber que nem todos os bioplásticos são considerados um material vantajoso para o problema que se enfrenta hoje em dia da acumulação de plásticos nos ecossistemas.

Existem também os **plásticos biodegradáveis** que se decompõem através da atividade de microorganismos aeróbicos ou anaeróbios. Este tipo de material é consumido completamente ou parcialmente pelos microorganismos e o carbono da sua estrutura é convertido em CO<sub>2</sub> durante o processo microbial.<sup>[29]</sup>

Existe ainda outro tipo de plástico, os **plásticos oxo-degradáveis**, que possuem uma taxa de degradação relativamente baixa. Estes materiais são de origem fóssil e por natureza não são biodegradáveis. No entanto, durante a sua produção são adicionados sais de metais de transição que vão induzir a sua decomposição. Como a



maioria destes plásticos não cumpre as normas europeias tais como a EN13432 (que regula as classificações de biodegradável e compostável), este material não pode ser considerado nem compostável nem biodegradável.<sup>[30]</sup>

Os **plásticos compostáveis** podem ser considerados biodegradáveis sob condições de humidade e temperatura específicas durante um período de tempo bem definido. A classificação de compostável pode ser dividida em compostável no lar ou compostável industrialmente, e é regulada por normas europeias.<sup>[29]</sup>

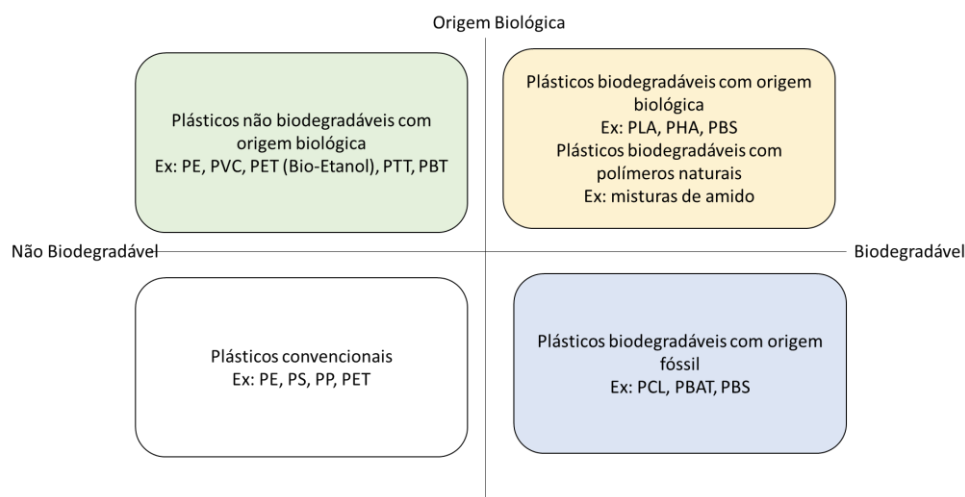


Figura 7: Esquema dos vários tipos de plásticos, análise da autora.

Atualmente existem vários tipos de bioplásticos no mercado, tais como objetos descartáveis: embalagens, sacos, talheres, entre outros. Os bioplásticos poderiam substituir muitas aplicações dos plásticos convencionais, contudo o seu custo e desempenho ainda são um problema. Alguns plásticos biodegradáveis mais conhecidos são o amido termoplástico, o políácido láctico (PLA) e os Polihidroxialcanoatos (PHA).

### Amido termoplástico

O amido é considerado uma das maiores reservas de hidratos de carbono nas plantas. É bastante utilizado industrialmente e é extraído das sementes dos cereais (como o milho, o trigo e o arroz), dos tubérculos (como a batata) e das raízes (como por exemplo a mandioca).<sup>[31]</sup> O amido é essencialmente composto por dois polissacáridos, a amilose e a amilopectina, e pode ainda conter pequenas quantidades de lípidos e proteínas.<sup>[32]</sup>

O processamento do termoplástico de amido ocorre geralmente pelo aquecimento do amido em meio aquoso, resultando na sua gelatinização. Este processo dá origem à perda de ordem molecular e fusão dos cristais de amido. A gelatinização não pode ocorrer sem a presença de um plastificante, uma vez que a temperatura de transição vítrea e de fusão são maiores do que a decomposição, sendo



a água o plastificante mais comum. No entanto, a água sai rapidamente do produto deixando-o frágil, deste modo plastificantes como o glicerol ou os açúcares podem ser adicionados.<sup>[31]</sup>

O amido termoplástico (TPS), é um material amorfo composto pelo amido plastificado. O TPS geralmente é produzido a partir de uma mistura de amido e plastificante numa extrusora a temperaturas entre os 140-160°C.<sup>[33]</sup> O amido termoplástico tem sido muito estudado desde os anos 70, uma vez que tem um baixo custo e podem ser modificados ou adicionados a outros polímeros, melhorando as suas propriedades.<sup>[32,34]</sup> O TPS sem modificação é sensível à humidade e é frágil, especialmente após envelhecimento, o que não acontece nos polímeros sintéticos. Alguns polímeros que são adicionados ao amido são, a quitina, a celulose, o PLA, a policaprolactona (PCL), polihidroxibutirato (PHB) entre outros.<sup>[31,33]</sup> Este material pode ser aplicado na produção de espumas (expandidos), filmes, sacos, etc. <sup>[31,34,35]</sup>

### **Polilactídeo ou Poli(ácido láctico) - PLA**

O PLA é um termoplástico poliéster alifático, biocompatível e biodegradável, que pode ser produzido a partir de recursos naturais não fósseis, através da fermentação de polissacáridos, como por exemplo do milho, da batata, da cana-de-açúcar, entre outros.

As propriedades mecânicas presentes neste polímero, podem ser comparadas às propriedades dos polímeros convencionais, nomeadamente a elevada elasticidade, rigidez, transparência, boa capacidade de moldagem, biocompatibilidade e comportamento termoplástico, sendo por isso considerado semelhante ao PET.<sup>[32,36,37]</sup>

Em condições de temperatura e humidade elevadas, o polímero tem tendência para se desintegrar em pouco tempo. O principal mecanismo de degradação é a hidrólise, seguido pelo ataque de bactérias. Sob condições normais de uso, o PLA é bastante estável, mantendo a sua massa molecular e propriedades físicas durante anos.<sup>[31,37,38]</sup> Devido à sua biocompatibilidade, o PLA pode ser utilizado para aplicações médicas, como implantes, fibras para suturas internas e sistema de administração de medicamentos.

Nos últimos anos, novas técnicas de produção mais económicas de PLA de alto peso molecular, contribuíram para a sua maior utilização em embalagens e no sector têxtil.<sup>[31-33]</sup> Devido ao crescimento do interesse deste polímero, prevê-se um rápido crescimento da sua produção nos próximos anos.

### **Polihidroxibutirato – PHB**

O PHB pertence à família dos polihidroxialcanoatos (PHAs), sendo a forma mais comum o P3HB. Estes poliésteres são produzidos por microorganismos a partir de vários substratos de carbono. Os PHAs são materiais lipídicos acumulados por uma grande variedade de microorganismos na presença abundante de uma fonte de carbono. As fontes de carbono assimiladas serão bioquimicamente transformadas em unidades de hidroxialcanoatos, polimerizadas e armazenadas na forma de inclusões insolúveis em água no citoplasma da célula. A capacidade de realizar este processo é dependente da presença de uma enzima, designada de PHA sintase. O polímero é acumulado no interior das células em forma de grânulos, sendo a fonte de energia das células. Após o seu isolamento da célula, o PHB é um termoplástico cristalino que possui propriedades semelhantes às do PP.<sup>[39]</sup>

O PHB possui propriedades bastante interessantes tais como a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e possibilidade de ser produzido a partir de fontes renováveis, tornando-o assim uma boa alternativa aos polímeros convencionais. Contudo, apesar de todas as suas qualidades, o PHB não consegue competir com o polipropileno e o poliestireno principalmente devido ao seu elevado custo de produção.<sup>[40]</sup> Este material pode ser utilizado para a produção de embalagens, produtos farmacêuticos e na produção de sacos.

### 1.3. *Medusa Catostylus tagi*

As medusas pertencentes ao Reino *Animalia*, são criaturas bastante misteriosas que existem no nosso planeta há mais de 650 milhões de anos. Estes animais pertencem ao filo Cnidaria e, a espécie alvo deste estudo, à classe *Scyphozoa*, uma das oito classes do filo, como ficou estabelecido em 2018 pela *World Register of Marine Species* (WorMS). Esta classe pode ser encontrada em todos os oceanos, e são frequentemente avistadas nas praias. O tamanho destes animais varia entre os doze milímetros até mais de dois metros, sendo a maior a *Cyanea arctica*, uma vez que possui tentáculos com mais de quarenta metros de comprimento.<sup>[41]</sup> Apesar de algumas possuírem grandes dimensões, as medusas não possuem cabeça, esqueleto nem nenhum tipo de órgão para a sua respiração ou excreção. O seu ciclo de vida normalmente envolve uma alternância entre a fase de pólipo e a de medusa livre, apesar de esta última ser usualmente a predominante nesta classe.

No estuário de Tejo está presente uma das mais importantes e grandes populações desta medusa, *Catostylus tagi* <sup>[42]</sup>(*Figura 1*), que viu no seu nome uma associação ao rio Tejo (Tagus), de onde é nativa e é considerada o segundo maior invertebrado da Europa, e por isso motivo de estudo nesta dissertação. A taxonomia que é atualmente adotada para *C. tagi* é a seguinte: domínio *Eukarya*, reino *Animalia*, filo *Cnidaria*, classe *Scyphozoa*, ordem *Rhizostomeae*, família *Catostylidae*, género *Catostylus*.



*Figura 8: Imagem de C.tagi. Retirada de [42]*

## Fisiologia

Estes animais não possuem cérebro, olhos, guelras nem coração. Como a maioria dos Cnidários, o corpo das medusas é basicamente um sino com simetria radial, constituído por duas camadas finas de células, uma exterior (ectoderme) e uma interior (gastroderme), tendo de permeio uma substância gelatinosa designada mesogleia, que pode formar uma camada bastante espessa.<sup>[43,44]</sup> A sua forma de sino tem uma abertura para o exterior, a abertura oral, e a sua forma pode variar desde um disco achatado até a uma campânula quase fechada. Na margem deste disco, as medusas apresentam coroas de tentáculos que podem conter ou não células urticantes (Figura 2).

O corpo das medusas possui cerca de 97% de água. Elas podem ser semitransparentes ou vítreas, apresentando mesmo assim algumas tonalidades amarelas ou de um azul esbranquiçado. A maioria das medusas são bastante frágeis, uma vez que contém menos de 5% de matéria orgânica sólida.<sup>[43]</sup> Nesses 5% de matéria orgânica sólida, aproximadamente 1 a 2% consiste em proteína, e entre 2-3% é referente a sal. A proteína em maior percentagem nas medusas é o colagénio.<sup>[45]</sup>

Os membros da classe *Scyphozoa* apresentam uma cavidade digestiva bastante simples que atua como garganta, estômago e intestino. Perto da abertura oral existem quatro a oito braços orais, que têm como função transportar alimentos que foram capturados pelos tentáculos.<sup>[43,44]</sup> As medusas apresentam um sistema nervoso bastante simples, do tipo nervo-rede (*nerve-net*), e é sináptico. Este sistema consiste em recetores capazes de detetar a luz, odor, entre outros estímulos e assim coordenar as respostas apropriadas.<sup>[46]</sup> Estes animais possuem umas estruturas que se movimentam gravitacionalmente ou pelo próprio movimento do animal, estimulam células sensoriais que produzem uma resposta e por via de conexões nervosas, informam o animal sobre a sua posição e orientação.<sup>[44]</sup>

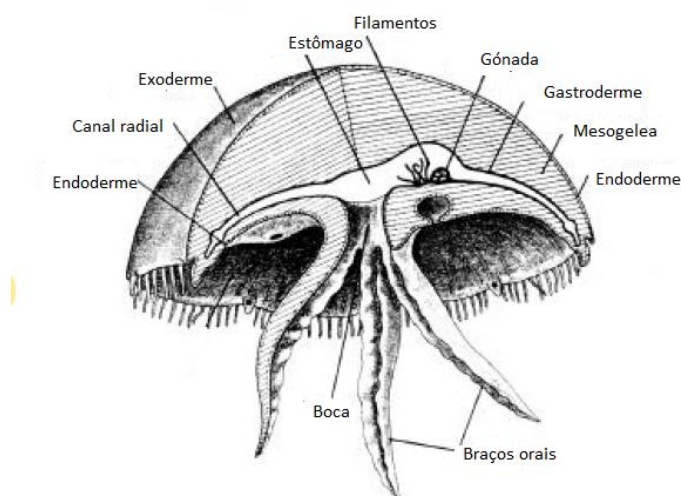


Figura 9: Fsiologia das medusas. Imagem adaptada de [43].

## Ciclo de Vida

As medusas desta classe possuem duas formas distintas, o pólipo e a medusa e, e podem reproduzir-se tanto sexualmente quanto assexuadamente e passam por cinco estágios de vida: ovo, plânula, pólipo, éfira e medusa (Figura 3). Não é conhecido ocorrer cuidado parental na classe *Scyphozoa*.

Estas medusas são gonocóricas, ou seja, têm os sexos separados, existindo assim ovogénese nas fêmeas e espermatogénese nos machos. No caso das fêmeas, as células que se vão desenvolver como óvulos surgirão do epitélio gastrodermal do ovário. À medida que os óvocitos crescem, existe a sua aglomeração gradual na mesogelea da gónada. Nos machos, os espermatozóides, desenvolvem-se em folículos formados pela invaginação do epitélio na mesogeleia do testículo. Os espermatócitos vão amadurecendo no centro do folículo até se formarem os espermatozóides, que posteriormente são libertados. Durante a reprodução o macho liberta os espermatozóides, que vão ao encontro da boca da fêmea onde vai ocorrer a fertilização. O ovo fertilizado desenvolve-se numa plânula, e é libertado pela fêmea. Ao serem libertadas, as plânulas procuram uma superfície para se fixarem, e acabam por se transformar em pólipos. O pólipo liberta diversas éfiras, assexuadamente, via estrobilização. As éfiras crescem e desenvolvem-se em medusas adultas, recomeçando o processo. Os pólipos podem reproduzir-se assexuadamente ou formar podocistos, estruturas que são capazes de viver por alguns anos, produzindo mais pólipos. Os podocistos são considerados importantes para a sobrevivência em condições adversas, como hipoxia ou temperaturas extremas.<sup>[43,44,47,48]</sup>

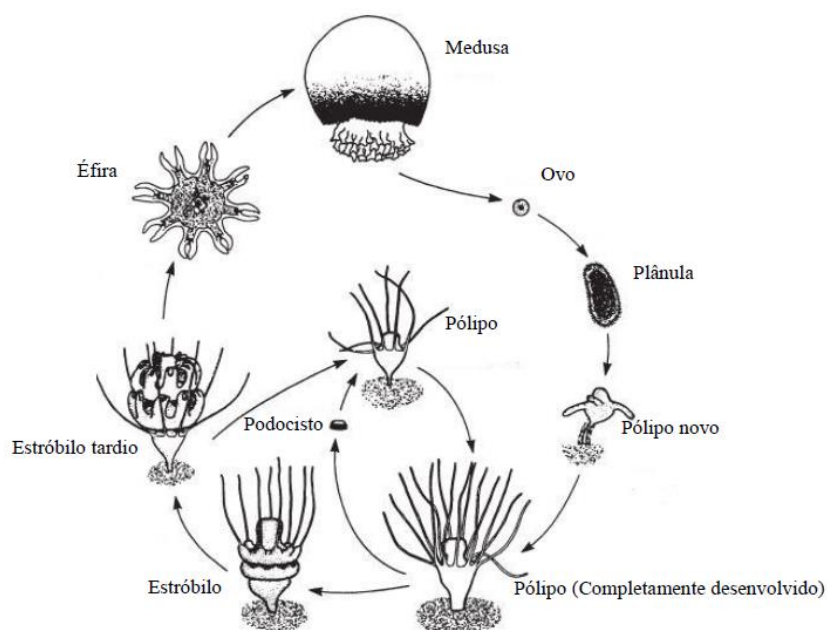


Figura 10: Ciclo de vida das medusas *Scyphozoa*. Imagem adaptada de [43].

## Locomoção

As medusas normalmente andam à deriva no mar, com um controlo limitado sobre os seus movimentos. Quando elas contraem os seus músculos circulares e radiais, o volume da água contido sob o “sino” diminui impulsionando-as. Este ritmo pulsante permite que exista uma regulação do movimento vertical. O movimento vertical em algumas medusas é importante, por exemplo no caso de espécies do género *Aurellia*, pois durante o dia elas movimentam-se em águas mais profundas, e durante a noite e no início das manhãs e das tardes encontram-se em águas superficiais. Apesar de as medusas conseguirem controlar os seus movimentos verticais, elas dependem muito das correntes oceânicas, das marés e do vento para se conseguirem movimentar horizontalmente.

#### 1.4. *Poli(D,L- Lactídeo co-glicolídeo) – PLGA*

O PLGA é considerado um copolímero sintético biodegradável descoberto nos anos 60, para uso nas suturas cirúrgicas.<sup>[49]</sup> O PLGA contém unidades alternadas de monómeros de ácido láctico e ácido glicólico.<sup>[50]</sup> O ácido láctico contém um átomo de carbono assimétrico, e por isso existem dois isómeros: L (+) ácido láctico e D (-) ácido láctico. O ácido láctico está presente no ambiente como intermediário ou como produto final no metabolismo dos hidratos de carbono. Encontra-se distribuído em várias criaturas vivas (homem, animais, plantas e microorganismos). Por outro lado, o ácido glicólico aparece na natureza de forma limitada. O copolímero degrada-se em produtos inócuos, e tem como produtos finais o lactato (sal derivado do ácido láctico) e o glicolato (sal derivado do ácido glicólico).<sup>[51]</sup>

O PLGA além de ser um poliéster consideravelmente hidrofóbico e instável em meios húmidos é também aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), daí o seu crescente interesse neste polímero. Os polímeros derivados dos ácidos glicólicos e lácticos são considerados polímeros biodegradáveis alternativos, devido à sua baixa toxicidade e ao facto de serem facilmente degradados no ambiente, nomeadamente em ambientes aquosos, através do controlo das proporções dos seus monómeros.<sup>[50,52,53]</sup> Como o lactídeo é mais hidrofóbico do que o glicolídeo, significa que os copolímeros de PLGA que tenham maior percentagem de lactídeo, serão menos hidrófilos, e por isso irão absorver menos água, fazendo com que a sua degradação seja mais lenta.<sup>[54]</sup> Devido à maior reatividade do glicolídeo em relação ao lactídeo, é usual este ser encontrado em maior percentagem em relação à sua proporção na mistura inicial de monómeros.<sup>[50,55,56]</sup>

##### Síntese:

A copolimerização do PLGA pode ser realizada de duas formas, sendo a primeira uma reação de policondensação direta entre o lactídeo e o glicolídeo, obtendo-se copolímeros de baixa massa molecular, uma vez que é difícil remover a água libertada;<sup>[57,58]</sup> e a segunda uma polimerização com abertura dos dímeros cíclicos do lactídeo e glicolídeo, resultando em copolímeros com massa molecular elevada, e melhores propriedades mecânicas.<sup>[55,56]</sup>

A polimerização de abertura do anel, permite um maior controlo da polimerização, e continua a ser o método mais usado para a síntese deste material. Como o lactídeo possui um carbono assimétrico, o lactídeo existe nas formas levogiro (L- lactídeo), dextrogiro (D – lactídeo) e na forma racémica D,L – lactídeo, sendo as duas primeiras formas semicristalinas e a forma racémica amorfa.<sup>[59]</sup> Para a polimerização proceder de forma razoável, será necessário a utilização de um catalisador. O catalisador mais comum é o 2-etil-hexanoato de estanho (II), mais

conhecido como octanoato de estanho,  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ . É um composto aceite pela U.S. FDA, altamente ativo (tempos normais para reações em massa com temperaturas entre os 140 e os 180°C variam entre minutos a poucas horas), e permite também a produção de polímeros de elevado peso molecular. [51,58] Apesar de muitos considerarem o octanoato de estanho como um catalisador ou um iniciador da polimerização do lactídeo, Kowalski et al. não o consider nem um catalisador nem um iniciador, uma vez que por si só não consegue iniciar a reacção polimerização. [60] Para tal é necessário um co-iniciador, nomeadamente um reagente prótico, como por exemplo um álcool, de forma a tornar a reacção mais rápida e a proporcionar o aparecimento da espécie iniciadora da polimerização. A polimerização é iniciada pelo produto da reacção de um álcool com o  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ , formando  $\text{OctSn-O-R}$ , promovendo desta forma a abertura do anel e o crescimento da macromolécula. [51,58,60,61] O álcool mais usado na reacção de polimerização do PLGA, é o álcool laurílico, uma vez que é considerado um controlador da cadeia da macromolécula. [62]

Usualmente a polimerização deve ser realizada em vácuo ou em atmosfera inerte (azoto). A polimerização do PLGA, quando produzido em grandes quantidades, a sua temperatura de reacção deve estar entre os 130-220 °C por um período de 2 a 6 horas, onde o  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  apresenta proporções entre 0,03 - 0,1% (m/m). [51,55,61] No final da polimerização, a purificação do polímero inicia-se com a sua dissolução em diclorometano, e de seguida dá-se a precipitação do polímero PLGA em excesso de metanol ou éter dietílico. No fim da purificação o polímero é recolhido por filtração e seco, normalmente numa estufa de vácuo. O polímero no fim deve ser armazenado sob vácuo ou embalado sob uma atmosfera inerte, em embalagens à prova de humidade. [51,53,63]

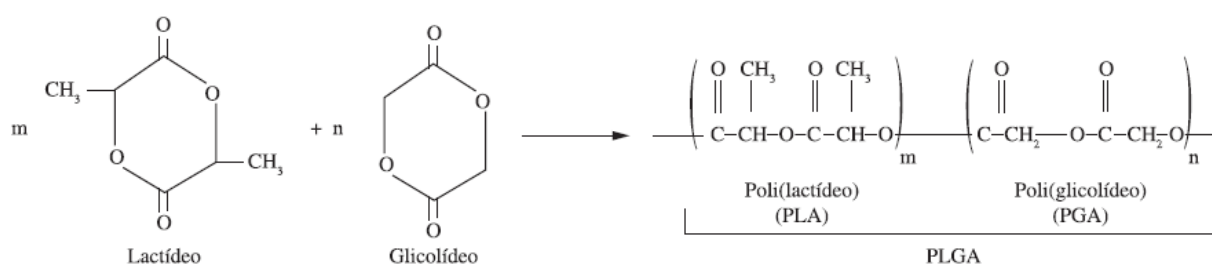


Figura 11: Estruturas químicas dos dímeros e polímeros e reacção de copolimerização do PLGA, adaptado de [49]



## Propriedades

De forma a ser possível obter diferentes formas de desempenho deste copolímero, existe a possibilidade da manipulação cuidadosa de três propriedades consideradas chave: a composição do PLGA, ou seja, a relação entre as percentagens de lactídeo e glicolídeo; a composição estereoisomérica do lactídeo (L- ou D,L-); e o peso molecular.<sup>[3]</sup>

Para uma melhor caracterização, processamento e aplicação deste copolímero, a sua solubilidade em solventes orgânicos é bastante importante. Um PLGA que contenha menos de 50% de glicolídeo na sua composição torna-se solúvel na maioria dos solventes orgânicos mais comuns, tais como os hidrocarbonetos halogenados (diclorometano), o acetato de etilo, a acetona, o dioxano e o tetra hidrofurano.

A cristalinidade do PLGA depende da composição química e estereoisomérica de unidades do lactídeo no copolímero. PLGA com quantidades de glicolídeo entre os 0 e 75% é amorfo, sendo também amorfo com quantidades de (L-)lactídeo na sua composição entre os 25-75%.

Este tipo de copolímeros são considerados materiais termoplásticos, exibindo uma boa estabilidade térmica na ausência de humidade. Em aquecimentos prolongados acima dos 200 °C o PLGA degrada-se em ácido láctico e ácido glicólico sob atmosfera de azoto ou vácuo.

## Degradação

Existem várias formas de degradação do PLGA e vários fatores que afetam essa mesma degradação. Os produtos finais da degradação são o ácido láctico e o ácido glicólico. Foi proposto para a degradação um processo de dois estágios.<sup>[64]</sup> No primeiro estágio ocorre a clivagem hidrolítica aleatória das ligações ésteres, levando à redução do peso molecular. No segundo estágio ocorre a perda de massa da matriz polimérica, acompanhada pelo aumento da taxa de cisão da cadeia. Alguns dos fatores que afetam a taxa de degradação do PLGA são os seguintes: <sup>[65–67]</sup>

1. Características do polímero: a composição química (relação lactídeo=glicolídeo), o padrão de distribuição dos monómeros, a composição química das extremidades da cadeia, distribuição do peso molecular, o peso molecular e a pureza do polímero (por exemplo, monómeros residuais). <sup>[68]</sup>
2. Características do dispositivo: como o tamanho, forma, porosidade e presença de aditivos (por exemplo, compostos ácidos ou básicos, plastificantes ou drogas).
3. *Melt-processing*: recozimento e esterilização.

4. Ambiente no qual a degradação ocorre: como local de implantação in vivo, o pH e temperatura do meio de degradação.

A degradação química e a composição estereoisomérica do lactídeo podem influenciar a degradação do PLGA, uma vez que eles determinam para além de outras propriedades, a hidrofília e a cristalinidade do polímero. O aumento da hidrofília aumenta a taxa de degradação do PLGA, enquanto um aumento da cristalinidade tem o efeito oposto. A hidrofília aumenta à medida que a proporção do glicolídeo (mais hidrofílico) no copolímero aumenta, e a cristalinidade aumenta à medida que a proporção de glicolídeos ou de unidades de L-lactídeos excede os 75%. Miller, Brady e Cutright descobriram que o PLGA (50:50) foi a composição que se degradava mais rapidamente, mas à medida que a quantidade de lactídeo ou glicolídeo era aumentada a taxa de degradação do copolímero ia diminuindo.<sup>[52]</sup>

Outra situação que pode contribuir para a degradação do PLGA, não é só a proporção dos monómeros, como também o padrão de distribuição dos dois monómeros na cadeia dos copolímeros. Como o glicolídeo é mais reativo que o lactídeo, esses copolímeros podem conter blocos de glicolídeo, em vez de uma sequência aleatória de glicolídeo e lactídeo. Portanto espera-se que os copolímeros que possuam uma microestrutura homogênea (sequência aleatória de monómeros) se degrade mais rapidamente do que os copolímeros que possuam uma microestrutura heterogênea.

O PLGA que apresenta pesos moleculares mais elevados degrada-se mais rapidamente do que aqueles que apresentam pesos moleculares mais baixos. Por fim os meios de hidrólise podem também afetar a degradação do polímero. Um meio básico pode retardar a degradação do PLGA em comparação com um meio ácido, uma vez que a degradação do polímero gera em grandes quantidades  $H_3O^+$  provocando assim a diminuição do pH do meio de hidrólise.<sup>[52]</sup>

## 2. Parte Experimental

### 2.1 Método de preparação das Medusas

As medusas *Catostylus tagi* foram recolhidas na região de S. João da Talha, na zona do estuário do rio Tejo, em Maio e Julho de 2018, pela equipa do professor Leonel Gordo. (Figura 12)

O estuário do rio Tejo é um ambiente aquático de transição entre o rio Tejo e o Oceano Atlântico. Possui uma vasta área composta por pântanos salgados, que funcionam como zonas de reprodução de organismos. Na zona superior e média do estuário, o sedimento é normalmente constituído por areia enlameada, enquanto na zona inferior e na área costeira adjacente predomina a areia.<sup>[69]</sup>

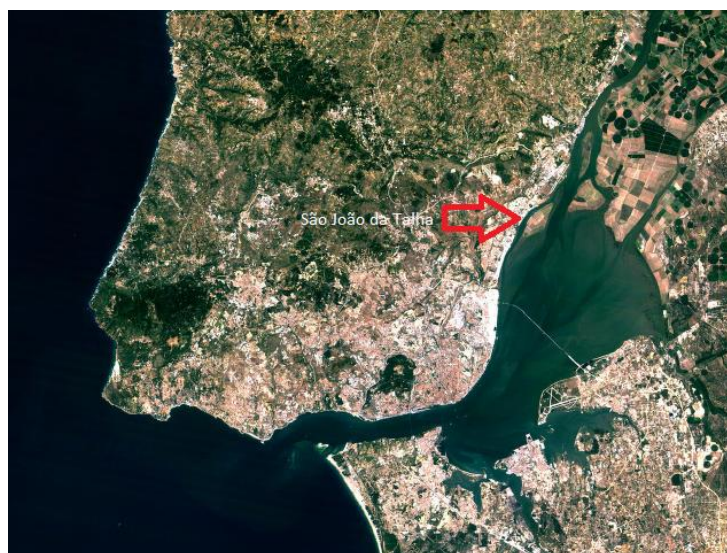


Figura 12: Localização de S. João da Talha

A zona onde as medusas foram pescadas encontra-se numa área de maior influência da água salobra/doce do rio, do que por exemplo, a zona da Trafaria que é essencialmente marinha. A Tabela 2 apresenta as características gerais do estuário do Tejo, nomeadamente a área, a profundidade média, a variação da maré, o fluxo médio, a temperatura, a salinidade e o oxigénio dissolvido.<sup>[70]</sup>

Tabela 2: Características gerais do estuário do Tejo.

Área (km <sup>2</sup> )	Profundidade média (m)	Maré (m)	Fluxo médio (m <sup>3</sup> S <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)		Salinidade média (g/kg)	O <sub>2</sub> dissolvido (mg/L)	
325	10	4	400	Min	Máx	34,5	Min	Máx
				12,8	22,2		1,9	9,2

O processo de recolha realizou-se num barco, onde depois de pescadas as medusas foram armazenadas em sacos de plásticos transparentes, juntamente com água salgada, algas e camarões de pequenas dimensões.

Ao longo do estudo foram realizadas duas recolhas, a primeira em Maio de 2018, onde as medusas pescadas tinham pequenas dimensões, não mais do que 3 centímetros de diâmetro, uma vez que estariam no início do seu crescimento. A segunda, em Julho de 2018, já tinham maiores dimensões, entre 15 a 20 centímetros de diâmetro, sendo que em cada saco continha uma ou duas medusas.

Depois da recolha os sacos com as medusas foram congelados, numa arca frigorífica convencional, até serem necessárias. Aquando da sua utilização as medusas são descongeladas à temperatura ambiente. Quando descongeladas, as medusas são retiradas dos sacos de plástico e são colocadas em alguidares limpos e secos e tenta-se retirar ao máximo a água salgada e algas, de forma a facilitar as lavagens. As medusas são lavadas várias vezes com água destilada, com a ajuda de um camaroeiro para facilitar a sua limpeza, retirando o máximo de água salgada, algas e sais das medusas. Nesta etapa é necessário algum cuidado, pois a estrutura das medusas encontra-se mais fragilizada devido ao congelamento e descongelamento. E deste modo as lavagens não podem ser muito demoradas, pois podem também destruir a estrutura das *C.tagi*. Depois de lavadas as medusas foram recolhidas com um camaroeiro, para se retirar o máximo de água possível, foram colocadas em caixas de Petri para a sua posterior liofilização.

Na etapa da liofilização as medusas foram colocadas num liofilizador Manifold Top Press Freeze Dryer LBFD-E11 da Labtron. O liofilizador foi colocado a uma temperatura inicial de  $-80^{\circ}\text{C}$  com uma pressão de 0,05 Pa. As medusas de maiores dimensões necessitaram de mais tempo para serem liofilizadas, cerca de 3 dias, enquanto as mais pequenas demoraram algumas horas. (Figura 13)



Figura 13: Medusas depois de Liofilizadas.

## 2.2 Síntese do Poli (D,L- Lactídeo – co - Glicolídeo) – PLGA

Tabela 3: Lista de reagentes utilizados na síntese do polímero.

Reagentes	Fórmula Química	Pureza	Fornecedor
D,L – Lactídeo	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	99%	Acros Organic
Glicolídeo	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	97%	Alfa Aesar
Álcool laurílico	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O	Puro	Merck
Octanoato de Estanho (II)	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> Sn	96%	Alfa Aesar
Metanol Anidro	CH <sub>3</sub> OH	≥99,8%	VWR
Diclorometano	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	≥99,5%	VWR

Para a síntese do PLGA (Tabela 3) foi utilizado o método da abertura dos anéis dos diésteres cíclicos dos seus monómeros, o glicolídeo e o D,L-Lactídeo. Nesta síntese a proporção de monómeros utilizada foi de 50:50, uma vez que esta proporção corresponde um tempo de degradação do polímero menor. Para além dos monómeros foi adicionado nesta síntese um iniciador, o octanoato de estanho com uma proporção de 0,02% sobre a massa total dos monómeros e um co-iniciador, o álcool laurílico com proporção de 0,01% sobre a massa total de monómeros. Nenhum dos reagentes sofreu purificação prévia, somente os monómeros estiveram sempre acondicionados num frigorífico.

Um reator com duas entradas foi utilizado para a realização da síntese do PLGA. Uma das entradas do reator permitia a entrada de azoto, de modo a garantir que a síntese era realizada sob atmosfera inerte, e a outra entrada foi utilizada para a colocação dos reagentes sendo posteriormente tapada. A reação foi realizada a uma temperatura de 175 °C, com uma variação de ± 5°C, durante duas horas, com recurso a um banho de silicone. Antes do início da reação todo o material de laboratório, foi previamente lavado e seco numa estufa, no mínimo 24 horas antes da sua utilização, de forma a tentar minimizar a presença de humidade no decorrer da síntese.

No final da reação, e depois do arrefecimento parcial do reator, o polímero foi dissolvido em diclorometano e posteriormente precipitado em metanol anidro, em excesso. De seguida, o PLGA foi filtrado e submetido ao processo de secagem numa estufa entre os 60-70 °C, por 48 horas (no mínimo), de forma a remover quaisquer solventes residuais ainda presentes. No fim, o polímero foi recolhido, pesado e armazenado para posterior caracterização.

## 2.3 Técnicas usadas na caracterização dos polímeros e das medusas

### I. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier - FTIR-ATR

A espectroscopia de infravermelho (IV) é uma técnica bastante utilizada nas mais variadas áreas da ciência, devido à sua rapidez e facilidade de execução bem como na seletividade da técnica. Esta técnica pode ser usada para identificação de compostos ou na investigação da composição de uma amostra, sem a sua destruição e na maioria das vezes sem a necessidade de tratamento prévio por parte das amostras.

A espectroscopia de Infravermelho tem como base o facto de as ligações químicas possuírem frequências de vibração específicas quando são expostas à radiação infravermelha. Os modos mais simples de movimento vibracional, que vão dar origem a absorções no infravermelho, são o de alongamento e o de flexão, que variam de acordo com a forma da superfície, da energia potencial, da geometria molecular, das massas dos átomos e do acoplamento de vibrações. As vibrações moleculares conduzem à absorção de radiação eletromagnética, induzindo as moléculas a transições moleculares, resultando em transições do estado fundamental para estados excitados de energia. As absorções são traduzidas em bandas, que podem ser de dois tipos, harmónicos ou bandas de combinação. O harmónico resulta na excitação das moléculas do estado de energia fundamental para estados mais energéticos e correspondem a frequências múltiplas da absorção fundamental. As bandas de combinação surgem de frequências que vibram acopladamente, surgindo assim frequências correspondentes a somas ou diferenças de duas frequências fundamentais.<sup>[71]</sup>



Figura 14: Equipamento de FTIR-ATR Spectrum Two UATR two, da Perkin Elmer.

A espectroscopia de infra-vermelho com transformada de Fourier, FTIR, permite a obtenção de espectro de infra-vermelho mais rapidamente, uma vez que a frequência da luz infravermelha monocromática não vai sendo variada, em vez disso, todos os comprimentos de onda são utilizados e conduzidos para um interferómetro. Este interferómetro possui um laser interno de referência, cuja frequência é conhecida com exatidão e muito precisa tornando-se assim um padrão interno de calibração do comprimento de onda.<sup>[71,72]</sup> Deste modo, a informação de todas as frequências é recolhida simultaneamente, permitindo leituras múltiplas da amostra e a sua média, aumentando a sensibilidade da análise. Assim, é obtido um espectro idêntico ao da espectroscopia de infra-vermelho convencional ou dispersiva. O FTIR permite aumentar a sensibilidade e diminuir o tamanho da amostra.<sup>[71,73]</sup>

A reflexão total atenuada (ATR) é uma técnica usada em conjunto com a espectroscopia de infravermelho, e que permite que as amostras sejam analisadas directamente no estado sólido ou líquido, não sendo necessário nenhum tratamento prévio. Um feixe de luz infravermelha passa através do cristal de ATR, de tal forma que ele reflecte pelo menos uma vez a superfície interna em contacto com a amostra. Esta reflexão forma uma onda evanescente, que se vai estender pela amostra. O feixe é recolhido por um detetor quando sai do cristal. Este efeito evanescente só acontece se o cristal for feito de um material óptico com um índice de refração maior do que a amostra estudada. Caso contrário, a luz é perdida na amostra. Os materiais mais utilizados para esta técnica são os que incluem germânio e seleneto de zinco. As excelentes propriedades mecânicas do diamante fazem dele um material óptimo para o ATR, mas o seu elevado custo impede que a sua utilização para esta técnica seja maior.<sup>[71,74]</sup> Neste trabalho foi utilizado o Spectrum Two UATR two, da Perkin Elmer, onde foram usados dois cristais, o primeiro de seleneto de zinco e o último de diamante. O software usado foi o PerkinElmer Spectrum IR. (Figura 14)

## II. Liofilização

Este processo é considerado um dos mais eficazes na desidratação de uma determinada amostras, onde com a utilização de um liofilizador, neste caso o Manifold Top Press Freeze Dryer LBFD-E11 da Labtron (Figura 15), consegue remover água ou solvente de um produto congelado. Pode ser considerado um processo de secagem, onde o material molhado, seja ele por água ou solvente, é primeiramente congelado ficando no estado sólido, e logo após é transformado para o estado gasoso, sem passar pelo estado líquido, através da sublimação.

O processo de liofilização (Figura 16) inicia-se com o solvente da amostra a ser congelado passando para o estado sólido (zona verde). De seguida, com a ajuda de uma bomba de vácuo, a pressão no interior da câmara, local onde as amostras estão posicionadas, é reduzida. (linha vermelha)

No fim, com o solvente ainda no estado sólido, é necessário proporcionar condições de forma a que este sublime sem passar pela fase líquida. A temperatura é novamente elevada para que a sublimação aconteça. (linha roxa)



Figura 15: Equipamento de Liofilização, Labtron

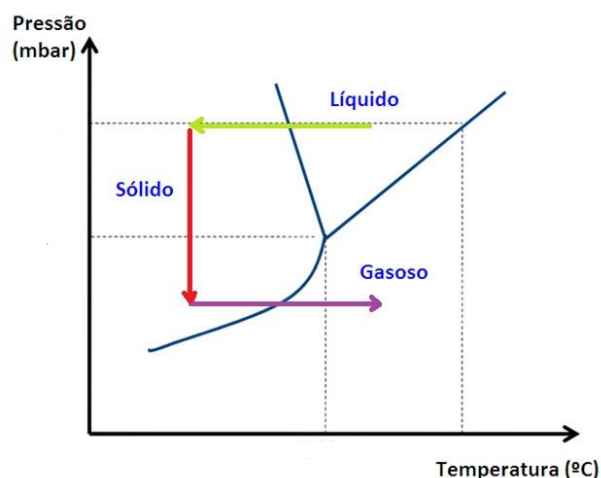


Figura 16: Diagrama de fase, representativo da fase de sublimação.



### III. Análise Termogravimétrica – TGA, e Calorimetria Diferencial de Varrimento - DSC

A análise termogravimétrica (TGA) foi definida pela ICTAC (Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria), como uma técnica onde a variação da massa de uma substância é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um aumento de temperatura controlado. O princípio desta técnica é bastante simples, tem como objetivo analisar a perda de massa de uma substância em relação à variação da temperatura.<sup>[75]</sup> A TGA possibilita o fornecimento de informações sobre vários fenômenos físicos, como transições de fase, absorção, adsorção e desadsorção, como também fenômenos químicos, como decomposição térmica, reações gás-sólido (por exemplo oxidação ou redução) ou dessolvatação.<sup>[76]</sup>

O aparelho de TGA tem como peças principais: uma balança, cadinhos de um material inerte, forno, termopares e um sistema de circulação de gás (normalmente designado purga). A amostra é colocada num cadinho, e levada ao forno num suporte ligado à balança. A temperatura é programada de forma a variar segundo critérios pré-definidos, enquanto que a balança vai fornecendo dados da massa em função da temperatura e do tempo. O sistema de circulação de gás é importante, uma vez que os gases presentes na altura da análise podem ou não reagir com a amostra, e essa reação pode influenciar as variações de massa.

A calorimetria diferencial de varrimento, ou DSC, é considerada uma técnica termoanalítica, onde o fluxo de calor para uma determinada amostra é monitorizado em função da temperatura ou do tempo, enquanto a temperatura da amostra é controlada. Esta técnica permite identificar processos endotérmicos ou exotérmicos, que ocorrem devido a transições de fase ou reações diversas que tenham a capacidade de causar variações de calor. Esta técnica permite ainda identificar transições vítreas, temperaturas de fusão e de recristalização em polímeros, por exemplo.

O DSC possui dois cadinhos idênticos (em termos de perdas de calor), um usado para a amostra e outro como referência. Cada cadinho tem o seu termopar e são aquecidas no mesmo programa de aquecimento. Pequenas diferenças de temperatura entre os cadinhos ocorrem devido a efeitos exotérmicos ou endotérmicos na amostra e são registados em função da temperatura programada. Desta forma obtém-se um gráfico da capacidade calorífica em função da temperatura programada.<sup>[77,78]</sup> Tanto nesta técnica como na técnica de TGA foi utilizado o STA 7200 da Hitachi. (Figura 17)

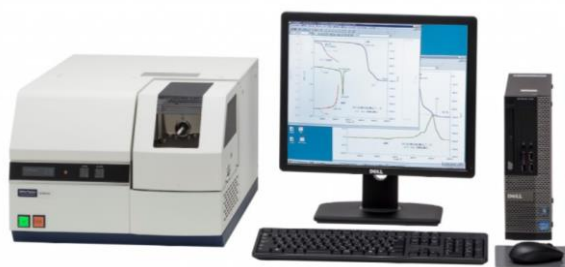


Figura 17: Equipamento TGA/DSC STA 7200, da Hitachi.

#### IV. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear - NMR

Como todas as formas de espectroscopia, a Ressonância Magnética Nuclear (NMR), entende-se pela interação da radiação electromagnética com a matéria. Esta técnica é usada para estudar as propriedades físicas, químicas e biológicas da amostra. Como consequência, a espectroscopia de NMR encontra aplicações em diversas áreas da ciência. A espectroscopia de NMR é um fenómeno que ocorre quando certos núcleos de átomos são imersos num campo magnético estático e expostos a um segundo campo magnético oscilante. Na presença desse campo magnético, os núcleos activos à NMR, como por exemplo  $^1\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$ , absorvem a radiação electromagnética a uma frequência característica do isótopo. Alguns núcleos não são sensíveis ao campo magnético, pois é necessário que os núcleos contenham um momento spin.

O NMR é um método definitivo para identificar compostos orgânicos. Os espectros de NMR são analiticamente tratáveis e normalmente são bastante previsíveis para moléculas mais pequenas. É possível distinguir diferentes grupos funcionais, contudo grupos funcionais idênticos mas com diferentes substituintes vizinhos também fornecem sinais distinguíveis.

A amostra a analisar deve ser dissolvida num solvente. A escala de tempo do NMR é grande, por isso não é adequada para observar fenómenos rápidos. <sup>[79–81]</sup> Neste trabalho foi utilizado o Avance 400 spectrometer da Bruker, onde o solvente usado foi o Diclorometano. O software utilizado foi o Sample Track. (Figura 18)



*Figura 18: Aparelho de NMR Modelo Avance 400 spectrometer, Bruker.*

## V. Microscopia Electrónica de Varrimento - SEM

A microscopia eletrônica de varrimento é um instrumento muito versátil para o estudo e análise de características estruturais e topográficas. Esta técnica não utiliza a luz (fotões) como radiação, mas sim um feixe de elétrons que vai interagir com a amostra, e por isso estas têm de ser tratadas, de forma a estarem estáveis em vácuo e serem condutoras. No SEM, um feixe de elétrons altamente focado percorre a superfície das amostras ponto por ponto, onde os elétrons secundários ou retrodifundidos pela amostra são identificados por detetores de elétrons, onde de seguida esse sinal é tratado por forma a criar uma imagem.

A apresentação característica desta técnica é uma imagem tridimensional da amostra, devido ao resultado da grande profundidade de campo do equipamento, bem como do efeito sombra-relevo do contraste de elétrons.<sup>[82-84]</sup> Neste trabalho foi utilizado o FEG-SEM JSM 700 1F da JEOL (Figura 19) e a amostra antes de ser analisada foi metalizada com ouro e paládio.



*Figura 19: Aparelho de SEM FEG-SEM JSM 700 1F, da JEOL.*

### 3. Discussão de Resultados

#### 3.1 Análise dos resultados das medusas

##### 3.1.1. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier - FTIR-ATR

As medusas liofilizadas foram submetidas a uma caracterização de FTIR-ATR demonstrada na Figura 20. Como a matéria orgânica das medusas é majoritariamente constituída por colagénio, na análise de infravermelho é possível encontrar bandas de absorção características desta proteína. O colagénio possui nove bandas de absorção características, nomeadamente as amidas A, B e I-VII. De todas as bandas, as amida I e II são as duas bandas vibracionais mais proeminentes da cadeia proteica. A região do espectro mais sensível aos componentes estruturais secundários da proteína é a banda amida I ( $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ), que aparece devido, maioritariamente, às vibrações de estiramento  $\text{C=O}$  das ligações peptídicas. A banda amida II, em contraste, deriva principalmente da flexão  $\text{NH}$  e da vibração de alongamento  $\text{CN}$ .

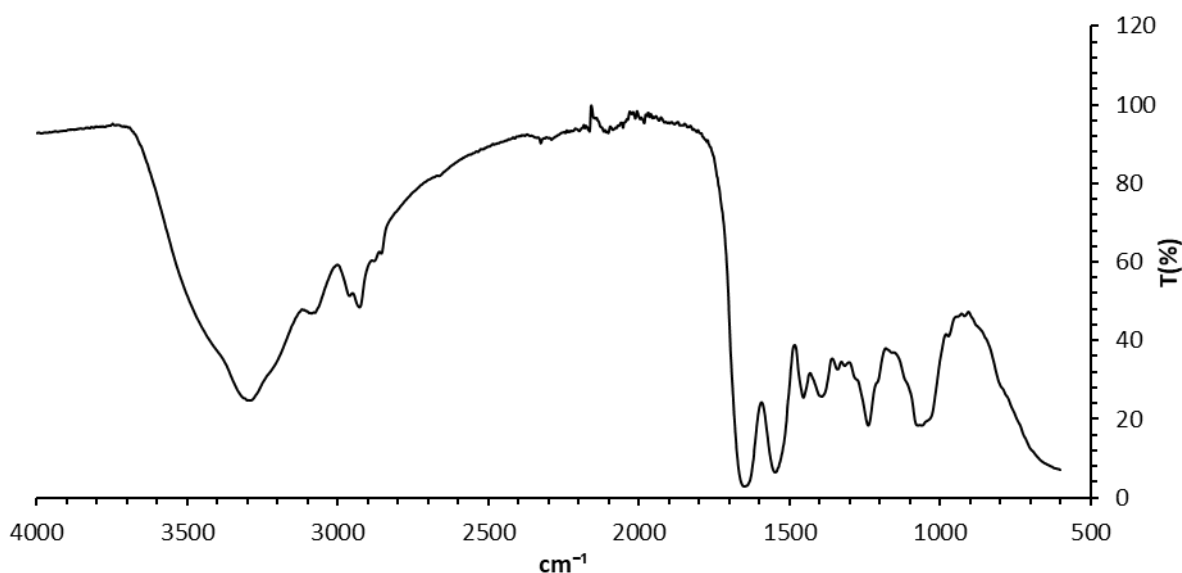


Figura 20: Espectro de Infravermelho das medusas liofilizadas.

Comparando o espectro de infravermelho das medusas liofilizadas com o um espectro típico de colagénio apresentado num estudo por Kong e Yu (2007), é possível observar bastantes semelhanças. Inclusivamente, no espectro das medusas observa-se as bandas mais relevantes do colagénio, neste caso as bandas amida A, I, II e III (3290, 1647, 1545 e 1238  $\text{cm}^{-1}$  respetivamente).<sup>[85]</sup>

No espectro das medusas liofilizadas, as bandas mais fortes observadas encontram-se na região dos 3300  $\text{cm}^{-1}$ , banda característica do alongamento do grupo NH, que corresponde à amida A. A banda característica do alongamento do grupo carbonilo (C=O) das ligações peptídicas, foi observada no pico 1647  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde à amida I. A amida II, que é característica do alongamento do grupo CN e da flexão do grupo NH, o seu pico correspondente é 1545  $\text{cm}^{-1}$ . Por fim, o pico 1238  $\text{cm}^{-1}$  observado no espectro de infravermelho, corresponde à amida III característica do alongamento do grupo CN e da flexão do grupo NH, como também corresponde à integridade das estruturas de tripla hélice de colagénio. (Tabela 4)

*Tabela 4: Representação dos picos característicos do colagénio.*

<i>Designação</i>	<i>Frequência aproximada (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</i>	<i>Picos observados (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</i>	<i>Descrição</i>
<i>Amida A</i>	3300	3290	Alongamento NH
<i>Amida B</i>	3100	--	Alongamento NH
<i>Amida I</i>	1700-1600	1647	Alongamento C=O
<i>Amida II</i>	1575-1480	1545	Alongamento CN, flexão NH
<i>Amida III</i>	1301-1229	1238	Alongamento CN, flexão NH
<i>Amida IV</i>	767-625	--	Flexão OCN
<i>Amida V</i>	800-640	--	Flexão NH fora do plano
<i>Amida VI</i>	606-537	--	Flexão C=O fora do plano
<i>Amida VII</i>	200	--	Torção esquelética

### 3.1.2. Calorimetria – TGA/DSC

O equipamento usado foi um STA 7200, da Hitachi. Este foi programado para um aquecimento dos 25 °C até aos 1000 °C, com uma rampa de aquecimento de 10 °C/min. Foi utilizado um cadinho de alumínio não selado e o gás de arraste escolhido foi o azoto com uma vazão de 100 ml/min. A massa da amostra foi cerca de 2,6 mg. Uma quantidade de massa pequena, mas a medusa liofilizada possui uma densidade muito baixa e é muito volumosa.

Através da análise do gráfico de DSC, apresentado na Figura 21, é possível determinar-se dois picos endotérmicos. O primeiro pico, perto dos 60°C, pode estar relacionado com alguma perda de água/solvente residual que ainda estivesse presente na amostra. Perto dos 200°C ocorre o segundo pico endotérmico, que pode estar relacionado com a desintegração das fibras de colagénio presentes na mesogleia, em fibras de menores dimensões. A temperatura da degradação ( $T_d$ ) total da amostra das medusas, é difícil de concluir, pois a partir dos 880°C os valores tornam-se negativos, apesar de segundo o TGA no final da caracterização ainda restar cerca de 15% de massa.

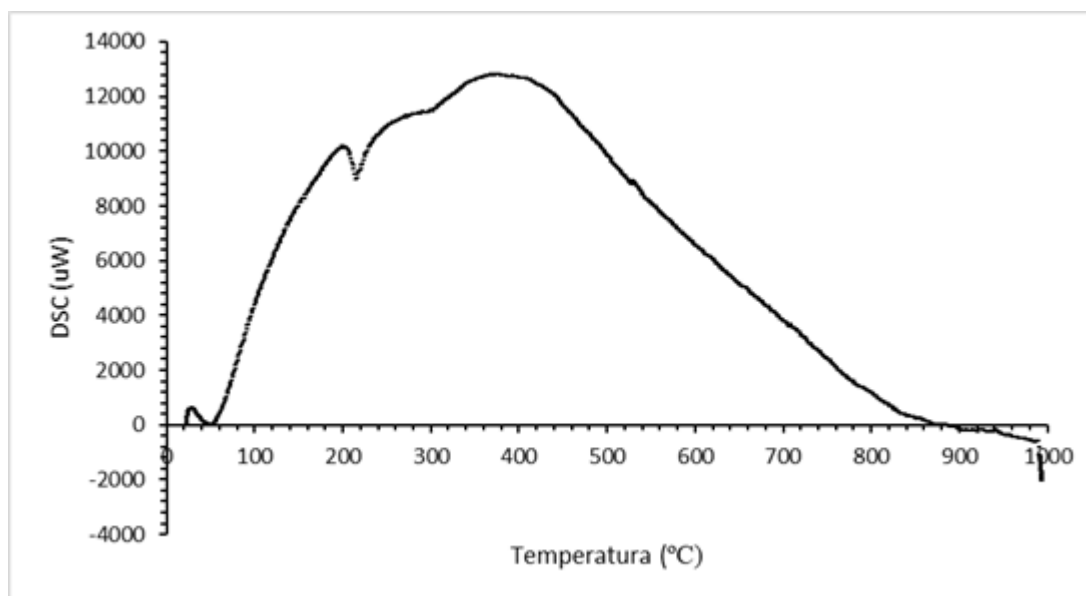


Figura 21: Espectro de DSC das medusas liofilizadas.

Os resultados das análises de TG das medusas liofilizadas encontram-se resumidos na Tabela 5. Os valores de  $T_{onset}$  e  $T_{endset}$  (temperatura inicial e final da perda de massa) e foram retirados das curvas de TG e os resultados da  $T_{deg.máx}$  (temperatura onde a perda de massa é máxima) da curva DTG das respetivas sínteses (Figura 22).

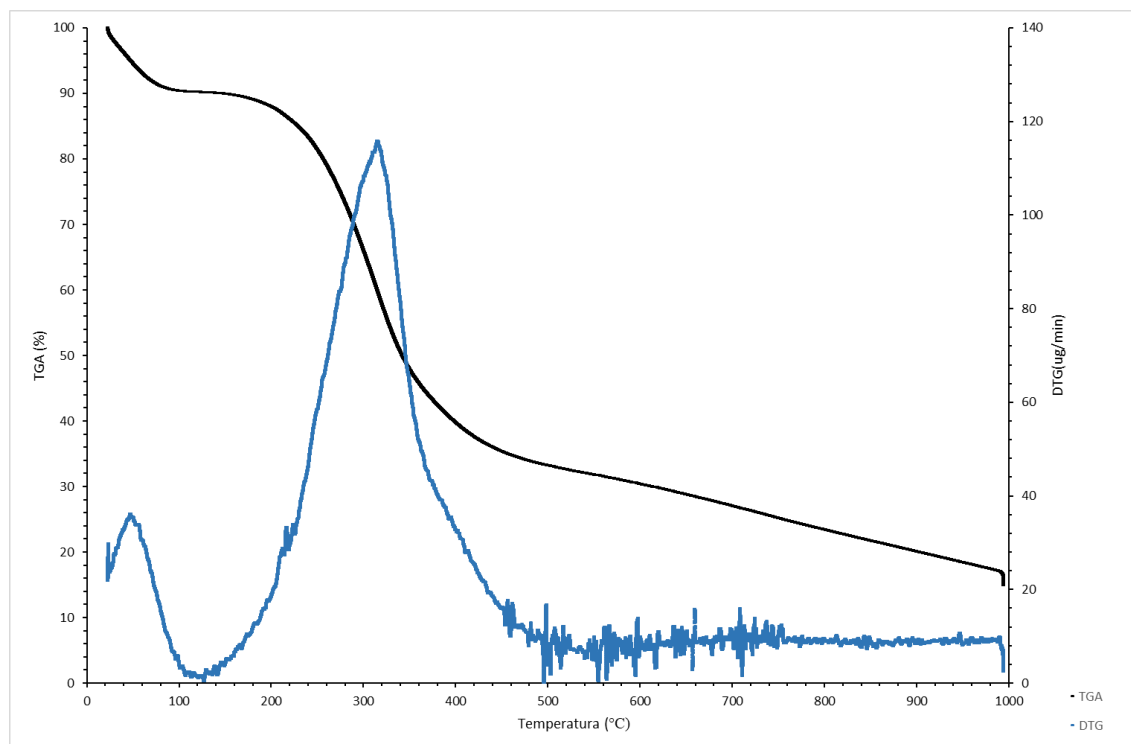


Figura 22: Espectro de TGA e DTG da amostra das medusas liofilizadas.

Os resultados da termogravimetria mostram um pico perto dos 60°C no espectro de DTG, o que tal como apresentado no espectro de DSC, pode estar relacionado com alguma perda de água/solvente residual que ainda estivesse presente na amostra. Outro pico foi observado aos 300°C, que segundo *Donghui Shi et al.* refere-se à degradação do colagénio, como foi referido anteriormente como um dos componentes principais da matéria sólida das medusas.<sup>[86]</sup> (Tabela 5). Em relação à  $T_{endset}$  (Temperatura final de perda de massa), o valor apresentado (440°C) está associado à degradação do colagénio. Tal como o valor de  $T_{deg.máx.}$  (Temperatura de degradação máxima) está relacionado com a degradação do colagénio e não com a degradação total da massa da amostra, uma vez que no fim de se atingir os 1000°C ainda restava no cadinho cerca de 15% da massa.

Tabela 5: Propriedades térmicas da amostra de medusas liofilizadas, no TGA..

Perda de massa (%)	$T_{onset}(^{\circ}C)$	$T_{deg.máx.}(^{\circ}C)$	$T_{endset}(^{\circ}C)$
85	220	300	440

Como as amostras utilizadas para este tipo de caracterização estavam liofilizadas, ou seja, não possuíam praticamente água na sua composição, realizou-se um teste numa balança de peso seco, de forma a determinar com maior rigor a quantidade de água presente nas medusas. No fim de lavadas, uma amostra das medusas no seu estado natural foi pesada, 1744 mg, e após a perda de água, foi novamente pesada (28 mg). Esta diferença de massas corresponde à percentagem de água presente nas medusas, que neste caso foi de 98,39%. Desta forma é possível provar que a maioria da água nas medusas é água livre, pois, por exemplo, poderiam espremer-se facilmente as medusas, mas depois não seria possível que elas retomassem a sua forma original, como que de uma esponja se trata-se voltam-se à sua forma inicial por absorção de água. Segundo *Jintang Zhu et al.* existe uma comparação interessante entre a perda de água nas medusas e o hidrogel sintético normal. Os hidrogéis podem por exemplo perder água lentamente por evaporação, mas não é possível espremer água através de testes mecânicos. Isto deve-se parcialmente à natureza hidrofílica dos polímeros presentes nos hidrogéis, e por isso a água encontra-se mais ligada a estes. Além disso, as cadeias poliméricas estão distribuídas aleatoriamente nos hidrogéis, e por isso, não existem “poros” reais nos géis.

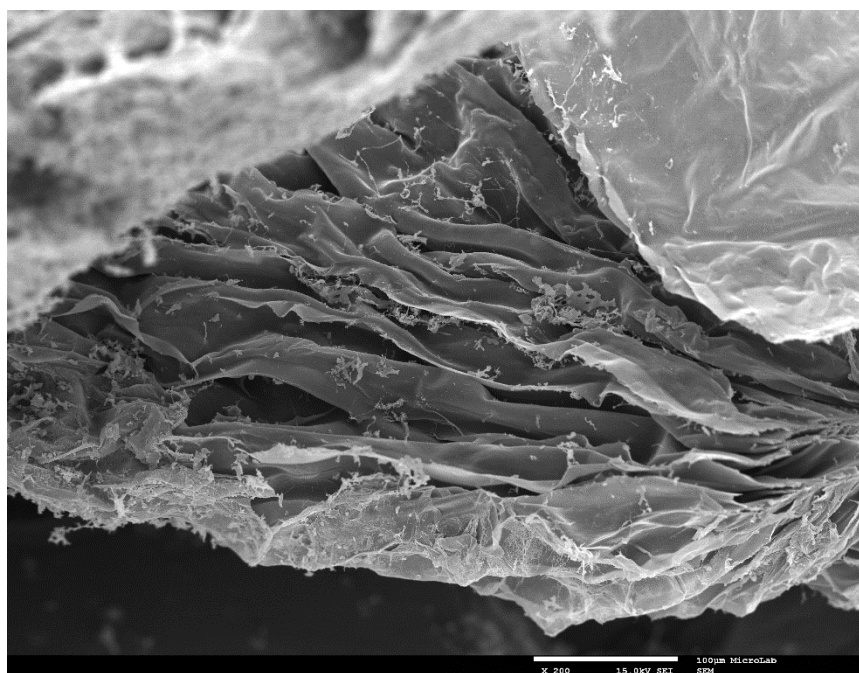
A desidratação nos hidrogéis pode apresentar um efeito significativo nas suas propriedades mecânicas, uma vez que as interações mais fortes, como por exemplo as ligações de hidrogénio, podem ser formadas entre as cadeias poliméricas que se tornam mais próximas entre si com a perda de água. Nas medusas sucede muito provavelmente o contrário, uma vez que a distância entre as fibras e as membranas na mesogleia é maior do que as cadeias poliméricas dos géis, de modo a que não há nenhuma interação forte formada entre as fibras.

Muito possivelmente só quando as medusas estiverem completamente secas, neste caso liofilizadas, as fibras e as membranas da mesogleia estão em contacto próximo, fortes interações podem ser formadas, e por isso a sua força mecânica aumenta drasticamente. Um evidência desse aumento da força mecânica é o facto de as medusas liofilizadas tornarem-se quase insolúveis em solventes orgânicos.<sup>[87]</sup>



### 3.1.3. Microscopia Electrónica de Varrimento - SEM

A análise microscópica das medusas foi realizada no MicroLab do Instituto Superior Técnico. Na Figura 23 é apresentada uma imagem representativa da superfície das amostras das medusas liofilizadas, com uma ampliação de 200 vezes onde é possível observar uma superfície com várias camadas enrugadas, isto deve-se ao facto de as medusas serem constituídas maioritariamente por água e ao dar-se a sua liofilização, ou seja, a retirada da água a sua estrutura fique com este aspeto.



*Figura 23: Imagem da superfície das medusas liofilizadas, com ampliação x200*

Em simultâneo com a análise de SEM, foi realizado a Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) da amostra para determinar a composição química presente nas medusas liofilizadas. As medusas são compostas maioritariamente por oxigénio e carbono. Através da análise de EDS foi também possível observar que as lavagens foram bem-sucedidas uma vez que não havia vestígios de cloro nem sódio (Figura 24).

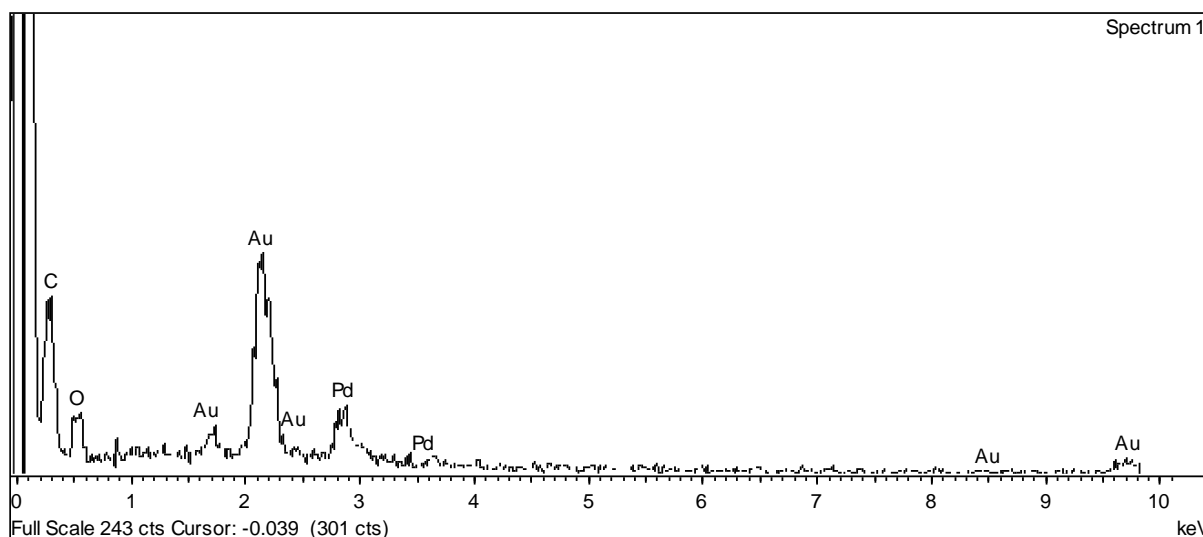
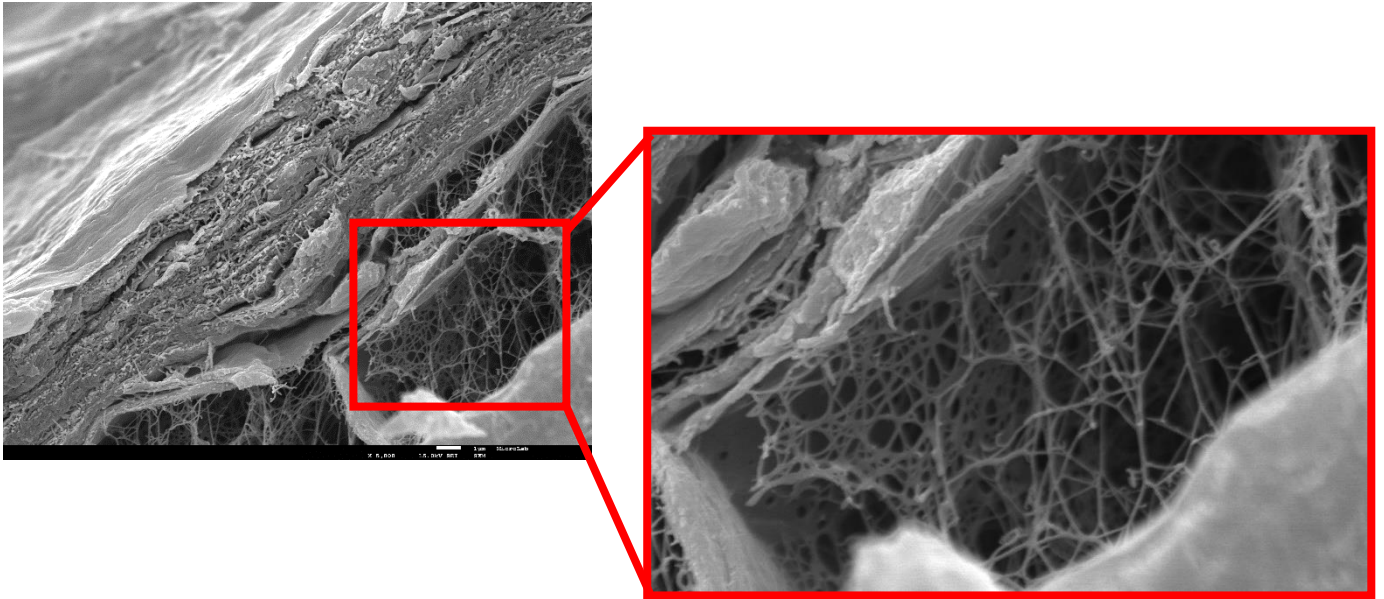


Figura 24: Espectro de EDS, dos componentes principais da amostra das medusas liofilizadas.

Na figura 25 é apresentado um corte transversal da amostra das medusas (aproximação de 1000 vezes). e é possível observar zonas com uma rede porosa entre camadas, que de acordo com Zhu et al. corresponde à mesogleia das medusas. Esta rede porosa é composta por membranas muito finas e densas e por fibras nanométricas formando uma malha que está ligada a essas membranas. Estas membranas da mesogleia estão dispostas paralelamente à superfície das medusas, sendo que as fibras estão dispostas perpendicularmente. A distância entre estas duas membranas da mesogleia é de alguns micrómetros. <sup>[87]</sup>A análise de SEM permitiu perceber que as medusas possuem uma microestrutura anisotrópica bem desenvolvida.

Como o colagénio é considerado o material principal da mesogleia nas medusas, as fibras podem ser formadas pela agregação do colagénio. <sup>[88]</sup> A hélice do colagénio é uma das principais estruturas secundárias do colagénio e consiste numa tripla hélice constituída por polipéptidos com uma sequência típica de (Gli-X-Y)<sub>n</sub>. Os resíduos X são normalmente prolina, enquanto que os resíduos Y são frequentemente hidroxiprolina ou hidroxilisina. A três cadeias estão ligadas entre si através de ligações de hidrogénio, entre os grupos N-H do péptido dos resíduos de glicina e os grupos CO dos resíduos das outras cadeias. Também estão presentes nas triplas hélices algumas ligações cruzadas covalentes, e uma certa quantidade destas ligações entre hélices de tropocolagénio pode levar à formação de agregados bem organizados, como as fibrilas.



*Figura 25: Imagens da rede porosa das medusas liofilizadas, com ampliação a 1000x.*

Desta forma, a mesogleia da medusa apresenta uma estrutura macroporosa em camadas com poros micrométricos, e esses poros são constituídos por fibras de colagénio interligadas entre si. Esta estrutura foi analisada em amostras de medusas liofilizadas, mas a sua estrutura no estado natural pode muito possivelmente ser a mesma, uma vez que não existe um mecanismo para a formação destas fibras através do processo de liofilização. Sendo assim, esta estrutura fornece uma rede rígida com canais que possivelmente têm como função a migração livre da água pela mesogleia, significando que a maioria da água presente nas medusas é considerada água livre.

### 3.2. *Análise dos resultados do PLGA*

As principais dificuldades encontradas na síntese do PLGA foi devida tanto à precisão da quantidade de iniciador (octanoato de estanho II) como à de co-iniciador (álcool laurílico) a adicionar, uma vez que eram necessárias quantidades muito reduzidas destes compostos (cerca de 2 microlitros), devido à escala em que as reacções foram conduzidas. Como as sínteses foram realizadas no Inverno, a viscosidade do iniciador foi outro grande problema tal como o facto do co-iniciador cristalizar parcialmente dentro da micropipeta.

#### 3.2.1. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier - FTIR-ATR

As várias sínteses do PLGA foram submetidos a uma caracterização estrutural por FTIR-ATR( Figura 26). Os espectros foram obtidos pelo equipamento Spectrum Two UATR two da *Perkin Elmer*, na faixa de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros de infravermelhos foram obtidos à temperatura ambiente,  $\pm 20^\circ\text{C}$ , e amostra em pó foi colocada diretamente sobre o cristal. Os espectros das sínteses 1, 3, 4 e 5 na região dos 2500 a 2000  $\text{cm}^{-1}$ , não apresentam o ruído que é observado nas restantes sínteses, uma vez que os espectros das primeiras sínteses foram realizados num equipamento idêntico (modelo igual) mas localizado à data nas instalações da Universidade Atlântica. O ruído observado nos restantes espectros, diz respeito ao cristal usado. Os primeiros espectros foram realizados recorrendo a um cristal de seleneto de zinco, já os últimos espectro foram obtidos através de um cristal de diamante.

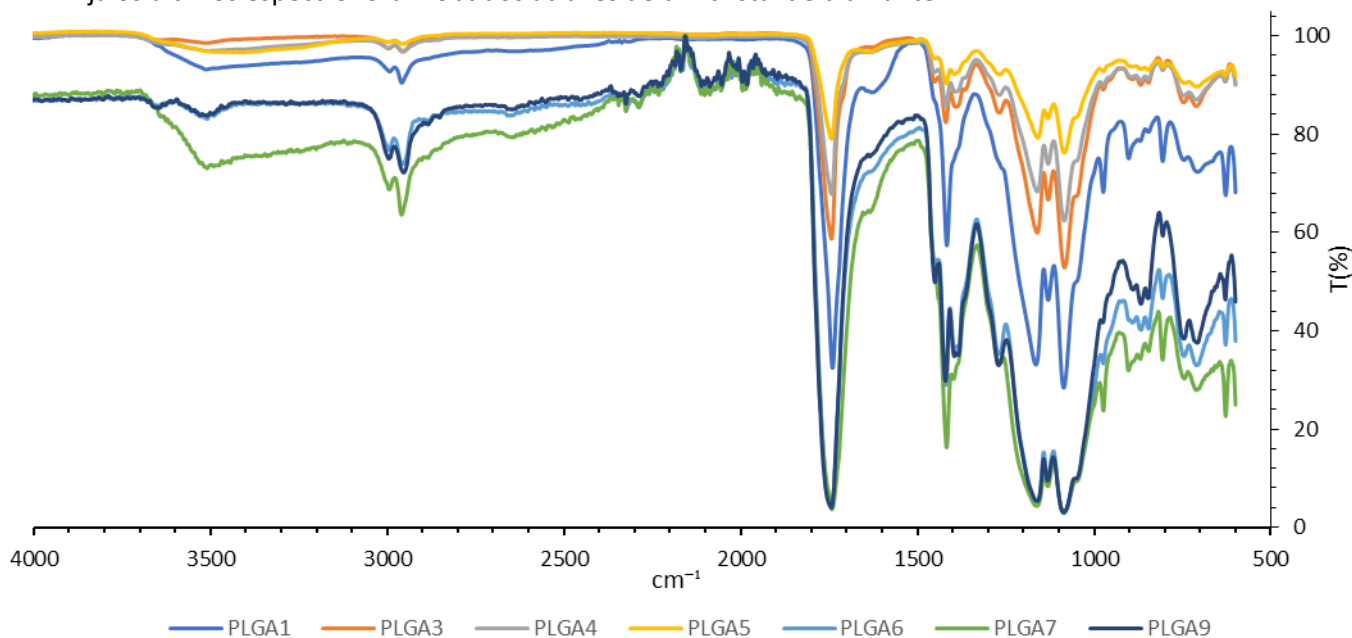


Figura 26: Espectros de FTIR-ATR das várias sínteses de PLGA.

Nos espectros do PLGA, as bandas com significado encontram-se na região entre 1750 e 1740  $\text{cm}^{-1}$ , características do estiramento do grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ). As bandas que são características do estiramento ao grupo ( $\text{C}-\text{O}$ ) foram observadas entre os 1300 e os 1150  $\text{cm}^{-1}$ . Foi ainda possível identificar bandas de absorção entre 3000 e 2900  $\text{cm}^{-1}$  características do estiramento dos grupos  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ . Finalmente, entre 1350 e 1150  $\text{cm}^{-1}$ , foi possível identificar os sinais característicos das vibrações do tipo “wag” dos grupos  $\text{CH}$  e  $\text{CH}_2$ .

Algumas sínteses apresentam bandas de absorção entre 3400 e 3600  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde ao estiramento do grupo  $\text{OH}$ . Esta banda pode ainda indicar algum teor de humidade nas amostras, de solvente residual ou de monómero glicolídeo que não reagiu, do 1º sobretom do grupo carbonilo [ $2 \times \nu(\text{C}=\text{O})=3490 \text{ cm}^{-1}$ ], que apresenta uma banda muito intensa na zona 1745  $\text{cm}^{-1}$  (aproximadamente), ou do álcool laurílico que não reagiu na síntese.

Na Figura 27 é apresentado o espectro de infravermelho, da síntese nº 5 do polímero PLGA. É possível observar que neste espectro estão presentes todas as bandas importantes para a caracterização do polímero por esta técnica. Neste espectro não se observa uma banda na região 3400 a 3600  $\text{cm}^{-1}$ , indicando que esta amostra não tinha humidade, ou que todos os reagentes iniciais reagiram totalmente.

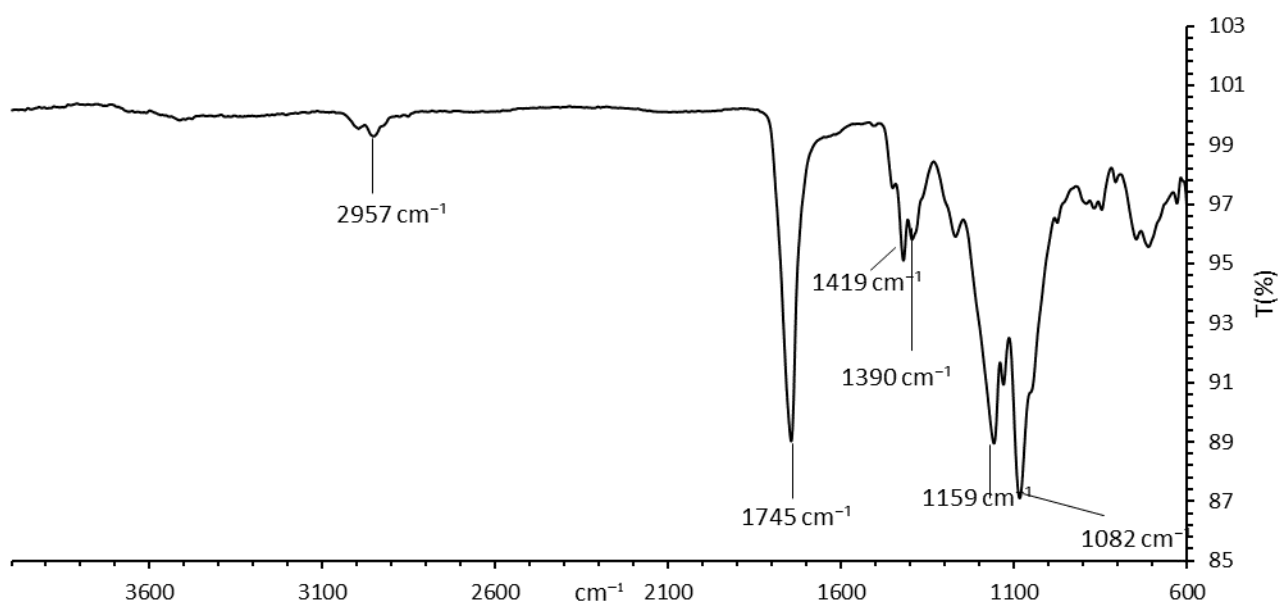


Figura 27: Espectro FTIR-ATR da amostra PLGA 5.

### 3.2.3. Calorimetria – TGA/DSC

O equipamento usado, como referido anteriormente, foi um Hitachi STA 7200. Este foi programado para um aquecimento de 5 °C/min entre 25 °C e 400 °C. Foi utilizado um cadinho de alumínio não selado e o gás de arraste escolhido foi o azoto com um fluxo de 200 ml/min. A massa inicial das amostras variou entre 10 e 13 mg.

Através das curvas de DSC, é possível observar as transições térmicas relacionadas com a transição vítrea e com a degradação das cadeias poliméricas (pico endotérmico). É possível perceber na curva, a ausência da transição de fase referente à fusão. Sendo assim, pode-se inferir que os polímeros analisados tratam-se de polímeros amorfos, o que está de acordo com relatado por outros autores.<sup>[89]</sup>

A tabela 6 apresenta as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) e de degradação ( $T_d$ ) das sínteses de PLGA. A gama de temperaturas de transição vítrea nas sínteses foi entre 48-55 °C e a gama de temperatura de degradação foi entre 279-346°C, (concordantes com os valores indicados por outros autores). Contudo noutros casos as temperaturas eram inferiores às apresentadas neste trabalho, uma explicação possível para este facto pode estar relacionado com a massa molar do polímero.<sup>[90]</sup> Visto que polímeros com menor massa molar tendem a degradar-se mais rapidamente do que aqueles que cuja massa molar é superior. (Figura 28)

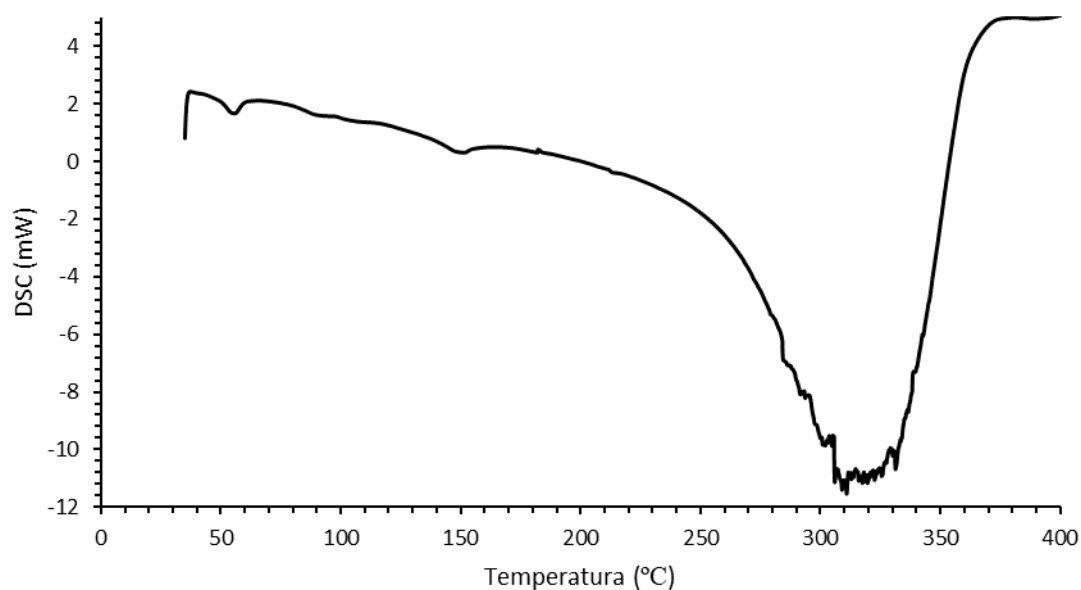


Figura 28: Espectro de DSC da síntese 5 de PLGA.

Os resultados das análises de TG para o polímero encontram-se resumidos na Tabela 7. Os valores de  $T_{onset}$  e  $T_{endset}$  (temperatura inicial e final da perda de massa) e foram retirados das curvas de TG e os resultados da  $T_{deg.máx}$  (temperatura onde a perda de massa é máxima) da curva DTG das respetivas sínteses.

Tabela 6: Propriedades térmicas das várias sínteses de PLGA, no DSC.

Amostra	$T_g$ (°C)	$T_d$ (°C)
PLGA 4	53	279
PLGA 5	55	310
PLGA 6	48	290
PLGA 7	52	346
PLGA 9	50	285

Os resultados da termogravimetria apresentados indicam que os polímeros são termicamente estáveis até 230 °C, visto que foi a menor temperatura em que se iniciou o processo de degradação da cadeia polimérica, na síntese 6 de PLGA.

Ao comparar as  $T_{deg.máx.}$  das várias sínteses, obtidas a partir das curvas de DTG, com as  $T_d$ , determinadas pelas curvas de DSC, é possível perceber que estão entre 280 e 370°C, aproximadamente. Tanto as  $T_{deg.máx.}$  como as  $T_d$  apresentam valores semelhantes entre si.

Comparando os resultados publicados na literatura, os polímeros sintetizados neste trabalho apresentam um comportamento de perda de massa semelhante e em concordância com o referido na literatura, apesar de a temperatura de início de degradação ser menor (Figura 29). A curva apresentada nesta figura representa a perda de massa (em %) e a derivada desta perda (DTG) em função da temperatura (em °C).

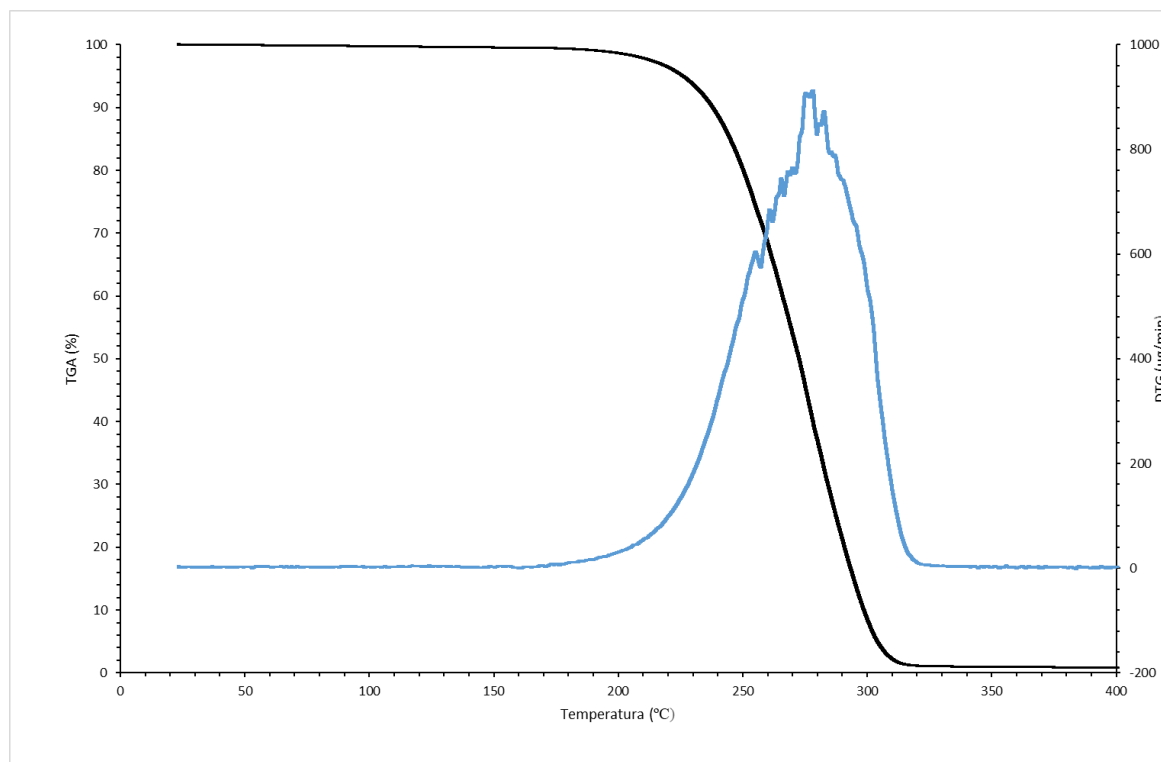


Figura 29: Espectro de TGA e DTG da amostra 4 de PLGA.

Tanto os resultados de DSC como de TG indicam a ausência de monómeros residuais nos copolímeros, uma vez que a haver tais resíduos identificar-se-ia nas curvas de DSC a presença de uma transição endotérmico característico de fusão de tais polímeros, e nas curvas de TG, a presença de dois eventos de perda de massa muito distintos. Contudo, para confirmar esta observação ter-se-ia que recorrer a outras técnicas analíticas.

*Tabela 7: Propriedades térmicas das várias sínteses de PLGA, no TGA.*

<i>Amostra</i>	<i>Perda de massa %</i>	<i>T<sub>onset</sub> (°C)</i>	<i>T<sub>deg.máx</sub> (°C)</i>	<i>T<sub>endset</sub> (°C)</i>
<i>PLGA 1</i>	99,9	250	365	380
<i>PLGA 3</i>	99,3	240	305	320
<i>PLGA 4</i>	99,2	240	279	320
<i>PLGA 5</i>	99,2	240	310	345
<i>PLGA 6</i>	99,1	230	279	310
<i>PLGA 7</i>	98,5	270	346	370
<i>PLGA 9</i>	99,2	250	294	345



### 3.2.4. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear - NMR

Procedeu-se à caracterização por NMR de duas sínteses de PLGA (a 5 e a 7), que foram solubilizadas em diclorometano. Os espectros foram usados para identificar os grupos funcionais característicos e para determinar também a razão entre os monómeros D,L-Lactídeo e Glicolídeo dentro dos polímeros de PLGA (Figura 30).

Os valores teóricos e experimentais das razões de monómero esperado e determinado das amostras de PLGA são apresentados na Tabela 8. Os dados determinados das sínteses foram calculados por duas equações (1 e 2), retiradas da literatura, onde  $M_L$  representa fração molar do lactídeo,  $M_G$  a fração molar do glicolídeo,  $P_L$  e  $P_G$  os picos de integração do lactídeo e do glicolídeo, respetivamente.<sup>[91]</sup> A contagem dos prótons foi realizada comparando as intensidades a 5,2 ppm e 4,8 ppm. A integração a 5,2 ppm é atribuída a um único próton do lactídeo, enquanto a integração a 4,8 ppm é atribuída a dois prótons do glicolídeo. Por essa razão, a integração a 4,8 ppm foi dividida por dois.

$$M_L = \frac{P_L}{P_L + (P_G/2)} \quad (1)$$

$$M_G = \frac{(P_G/2)}{P_L + (P_G/2)} \quad (2)$$

Tabela 8: Valores teóricos e experimentais das sínteses 5 e 7 de PLGA.

Síntese	Valores iniciais D,L- Lactídeo/Glicolídeo (%)	Valores experimentais D,L- Lactídeo/Glicolídeo (%)
PLGA 5	50/50	60/40
PLGA 7	50/50	70/30

Os valores determinados revelam uma diferença relativa em relação aos valores teóricos. A diferença observada pode ser derivada por exemplo a uma fraca atmosfera inerte. Além disso, é possível observar uma maior proporção de dímero de lactídeo (ou seja o anel de lactídeo aberto) por reagir em comparação com a proporção de glicolídeo no polímero de PLGA, uma vez que o glicolídeo tem uma maior reatividade em comparação com o lactídeo. Mas esta diferença de proporção também pode derivar da necessidade de purificar o lactídeo, pois com o passar do tempo este vai “absorvendo” água.

Com a análise dos espectros de NMR é possível compreender que apesar de as outras técnicas revelarem uma síntese bem conseguida, sem a existência de monómeros por reagir, o NMR demonstra o contrário, pois apesar de existir polímero nas amostras das várias sínteses também existe principalmente D,L-Lactídeo por reagir.

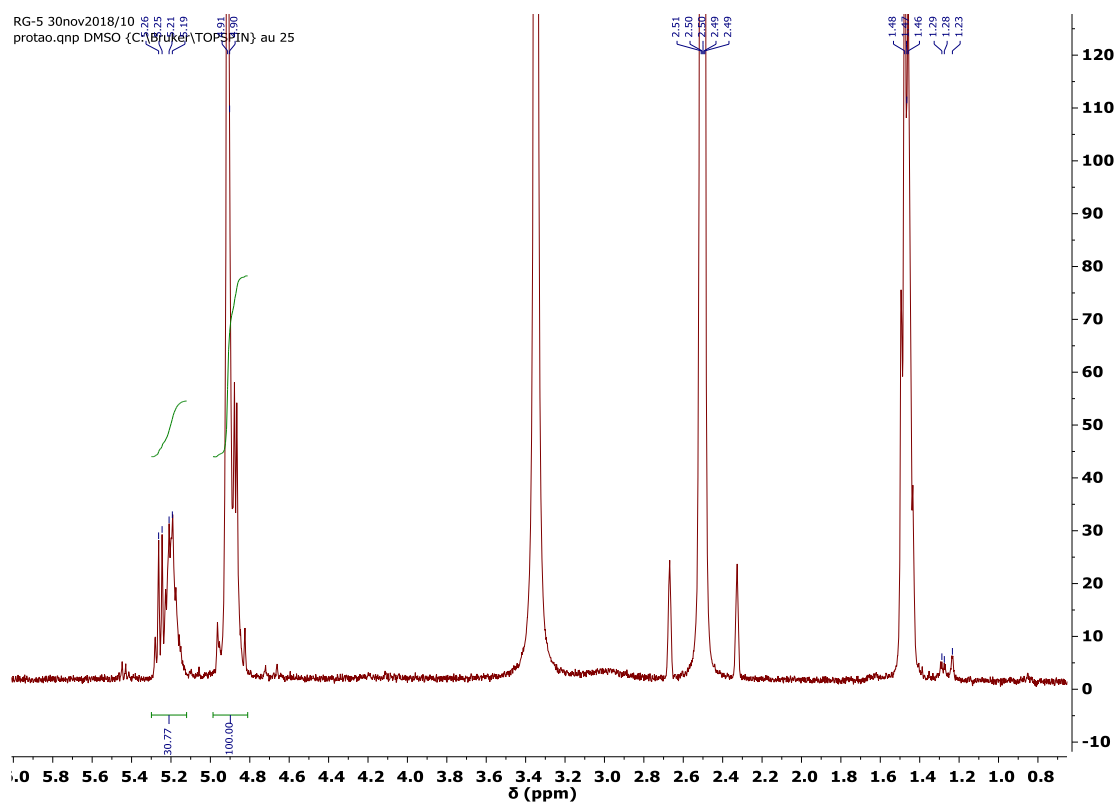


Figura 30: Espectro de NMR da síntese 5 de PLGA.

## 4. Conclusões

Com base no trabalho desenvolvido ao longo desta dissertação é possível fazer algumas conclusões sobre o tema da síntese de polímeros biocompatíveis para utilização em ambiente aquático. O estudo realizado com as medusas liofilizadas demonstrou que para além de ser um animal muito simples, ainda há muito que explorar sobre esta espécie. A caracterização por infravermelho revelou, um espectro bastante semelhante aos espectros de colagénio presentes na literatura, concluindo que esta proteína é o seu componente principal na matéria orgânica das medusas. Inclusivamente, o espectro das medusas revela as bandas vibracionais mais proeminentes da cadeia proteica, a amida I e II. Estas bandas revelam também a estrutura secundária principal do colagénio, e banda amida III corresponde à integridade da estrutura da sua tripla hélice. Em relação ao tipo de colagénio presente nas medusas este não foi identificado, uma vez que na literatura não é perceptível qual o tipo de colagénio para tipo I, II ou mesmo tipo V ou XI. As *C. tagi*, segundo um estudo de M.T. Calejo et al, revela que esta espécie de medusa é composta por 3 cadeias distintas, seguindo a disposição  $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ , semelhante ao tipo V ou XI de colagénio. Foi também encontrada uma composição de cadeia semelhante em medusas, como a *S. meleagris*<sup>[90]</sup> e a *S. nomurai*<sup>[91]</sup>, como para outros animais invertebrados marinhos<sup>[92]</sup>. A ocorrência de colagénio do tipo V e tipo XI em invertebrados inferiores, particularmente de origem marinha, tem sido considerada comum e representativa da evolução molecular dos colagénios vertebrados.

A caracterização térmica das medusas liofilizadas, revelaram que segundo o DSC a transição registada a 200 °C pode estar relacionado com a desintegração das fibras de colagénio em fibras de menores dimensões. Por outro lado, o TGA releva que a degradação do colagénio acontece perto dos 300 °C, não sendo possível determinar a temperatura de degradação total da amostra de medusas, pois no final da caracterização ainda restava cerca de 15% da massa total da amostra. Através desta caracterização foi possível entender que segundo *Jintang Zhu et al.* existe uma comparação interessante entre a perda de água nas medusas e o hidrogel sintético normal, uma vez que com a perda de água nos géis (desidratação), estes podem formar interações fortes (ligações de hidrogénio) entre as cadeias poliméricas levando a uma alteração drástica das suas propriedades mecânicas. Muito possivelmente isto só acontece nas medusas quando estas estiverem completamente secas (liofilizadas), as suas fibras e membranas estarão em contacto mais próximo e poderá existir a formação de interações entre elas, tornando-as quase insolúveis, por exemplo. Sendo assim, as medusas secas possuem propriedades mecânicas semelhantes a alguns plásticos sintéticos, uma vez que as fibras fortes e a sua distribuição uniforme são consideradas umas das razões para as altas resistências mecânicas das medusas, nomeadamente da sua mesogleia.

Através da análise dos resultados de EDS foi possível perceber que as lavagens realizadas nas medusas foram bem-sucedidas, visto que não foram encontrados vestígios de cloro nem de sódio na sua superfície. Com as imagens de SEM foi possível observar uma região composta por uma rede porosa que representa a zona da mesogleia. Como o colagénio é o principal componente da matéria orgânica das medusas, esta rede porosa composta por várias

fibras, são formadas pela agregação do colagénio. Como foi possível perceber pela análise de FTIR, o colagénio presente nas *C. tagi* consiste numa tripla hélice, onde as cadeias estão ligadas entre si por ligações de hidrogénio, levando à formação de agregados bem organizados. Apesar de esta estrutura macroporosa ter sido observada em medusas liofilizadas, acredita-se que a estrutura é a mesma no seu estado natural, visto que não existe um mecanismo para a formação destas fibras através do processo de liofilização. Esta estrutura rígida muito provavelmente possui como função a migração da água pela mesogleia, significando que a água presente nas medusas é considerada água livre. Sendo assim, a água é mantida mecanicamente na rede rígida presente na mesogleia. Uma comparação interessante entre as medusas e os hidrogéis sintéticos é o facto de nestes últimos a água não pode ser espremida durante testes mecânicos descritos na literatura. Isto deve-se principalmente à natureza hidrofílica dos polímeros nos hidrogéis sintéticos, e, portanto, têm mais água ligada a eles. Além disso, as cadeias poliméricas são distribuídas aleatoriamente nos géis, e por isso não existem “poros” reais nos hidrogéis no seu estado natural, embora os “poros” possam ser observados por SEM quando os géis são congelados e as cadeias poliméricas colapsam para formar os “poros”. Pelo contrário, a maior parte das medusas possui uma rede porosa na sua constituição, fazendo com que a maior parte da água presente nas medusas, seja água livre que circula nessa rede porosa.

As dificuldades encontradas nas diversas sínteses do PLGA, foram principalmente o rigor na medição tanto do iniciador (octanoato de estanho II) como do co-iniciador (álcool laurílico), uma vez que a quantidade total produzida de monómeros não foi muito grande, pois os custos dos reagentes era elevado, chegando a um total de 790€. Neste trabalho cada grama de PLGA tinha um custo só a nível de reagentes gastos, cerca de 8,32€.

Os espectros de infravermelho das diversas sínteses de PLGA foram todos bastante semelhantes entre si e em relação aos encontrados na literatura, tendo sido identificadas as principais bandas de absorção características do PLGA, tais como as bandas do estiramento do carbonilo ( $1750$  e  $1740\text{ cm}^{-1}$ ), as bandas características do estiramento do grupo C-O ( $1300$  e  $1150\text{ cm}^{-1}$ ), as bandas do estiramento dos grupos CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> ( $3000$  e  $2900\text{ cm}^{-1}$ ) e as bandas das vibrações do tipo “wag” dos grupos CH e CH<sub>2</sub> ( $1350$  e  $1150\text{ cm}^{-1}$ ). Em algumas sínteses foi possível observar as bandas de absorção entre  $3400$  e  $3600\text{ cm}^{-1}$ , que segundo a literatura são representativas do estiramento do grupo OH. Esta banda pode indicar a presença de humidade nas amostras, de solvente residual ou de monómero glicólico que não reagiu ou de álcool laurílico que também possa não ter reagido.

A caracterização térmica do PLGA das várias sínteses, revela que as temperaturas de transição vítrea estão entre  $48$ - $55\text{ °C}$  e a temperatura de degradação entre  $279$ - $346\text{ °C}$ . Estes valores são semelhantes aos reportados por outros autores, contudo alguns autores referem que as temperaturas eram inferiores às apresentadas neste trabalho, o que pode estar relacionado com a massa molar do polímero, uma vez que polímeros com maior massa molar degradam mais lentamente do que aqueles com menor massa molar.

Tanto as curvas de TG como as suas derivadas (DTG), apresentam uma estrutura semelhante às encontradas na literatura. Os polímeros sintetizados são termicamente estáveis até aos  $230\text{ °C}$ . Tanto os resultados de DSC como de TG indicam a ausência de monómeros

residuais nos polímeros, visto que nas curvas de DSC não se observou um registo endotérmico característico da fusão, e nas curvas de TG não foi possível observar dois registos de perda de massa bastante distintos.

Com a análise dos espectros de NMR para as sínteses 5 e 7 do PLGA, foi possível determinar através de cálculos as frações molares experimentais para cada síntese. As sínteses 5 e 7 obtiveram uma fração molar de D,L-lactídeo/glicolídeo de 60/40 e 70/30, respetivamente. Estes resultados revelam uma diferença significativa em relação aos valores teóricos (50/50 para ambas as sínteses). A diferença observada pode ser derivada da fraca atmosfera inerte, e de haver uma maior proporção de dímero de lactídeo (ou seja, o anel de lactídeo aberto) por reagir em relação à proporção de glicolídeo. Isto pode dever-se ao facto de com a incerteza da proporção tanto do iniciador como do co-iniciador levarem ao difícil controlo do tempo da reação, aliado à elevada reatividade do glicolídeo, culminando na presença de dímero de lactídeo por reagir.

Com a análise dos espectros de NMR é possível compreender que apesar de as outras técnicas revelarem uma síntese bem conseguida, sem a existência de monómeros por reagir, o NMR demonstra o contrário, pois apesar de existir polímero nas amostras das várias sínteses também existe principalmente D,L-Lactídeo por reagir.

Concluindo, foi possível produzir PLGA no laboratório que muito provavelmente pode ser utilizado em ambientes aquáticos, uma vez que segundo o estudo realizado nesta dissertação e na literatura, o polímero é adequado com a vida aquática, pois degrada-se em ácido láctico e ácido glicólico, que estão presentes nos organismos vivos.

As medusas liofilizadas, apresentam vantagens tecnológicas, uma vez que no fim de secas no liofilizador, adquiriram uma textura esponjosa semelhante à de um poliestireno expandido. Com a perda de água, as *C.tagi* possivelmente criam interações fortes entre as fibras e as membranas nelas presente, tornando-as quase insolúveis na maioria dos solventes orgânicos e com capacidade para aguentar elevadas temperaturas sem se degradarem totalmente. Esta resistência às altas temperaturas a que foram submetidas será alvo de uma publicação uma vez que o estudo térmico aqui iniciado revela resultados pioneiros.

## 5. Perspectivas de Trabalho Futuro

Futuramente seria interessante prosseguir com alguns estudos iniciados neste trabalho, pois ficaram muitas perguntas por responder. Nomeadamente seria interessante um estudo mais aprofundado tanto das medusas liofilizadas como no seu estado natural, por exemplo a realização de GPC, NMR, HPLC com padrões, espectrometria de massa e técnicas de tensão, de forma a existir uma melhor percepção da estrutura química das mesmas, inclusivamente se existe algum tipo de polímero natural presente nesta espécie. Também seria interessante tentar extrudir as medusas de forma a perceber se no fim da sua extrusão se obteria fio.

Na parte da síntese do polímero PLGA, poder-se-ia proceder à purificação dos monómeros antes da realização da síntese, e a sua posterior caracterização, de modo a comparar com os resultados obtidos neste trabalho e perceber se iriam existir diferenças. Poderia também proceder-se à extrusão do polímero PLGA com amido termoplástico, de maneira a tentar criar um copolímero e de seguida proceder-se à sua caracterização. E testar todos estes polímeros numa imersão em água do mar, de modo a estudar o seu comportamento.

## 6. Referências Bibliográficas

- [1] W. C. Li, H. F. Tse, L. Fok, *Science of The Total Environment* **2016**, 566–567, 333–349.
- [2] M. Gilbert, in *Brydson's Plastics Materials*, Elsevier, **2017**, pp. 1–18.
- [3] A. L. Andrady, M. A. Neal, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2009**, 364, 1977–1984.
- [4] W. B. Carothers, D. A. N-D (CARBO. L. C. ACD SAS AND PROCESS OF PREPARNG SAME, **1938**.
- [5] S. E. M. Selke, J. D. Culter, *Plastics Packaging: Properties, Processing, Applications, and Regulations*, Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG, München, **2016**.
- [6] H.-G. Elias, *Macromolecules Volume 4: Applications of Polymers*, Wiley-VCH, Germany, **2009**.
- [7] K. M. Nicholas, *Selective Catalysis for Renewable Feedstocks and Chemicals*, **2014**.
- [8] *Plastics - the Facts 2017*, Association Of Plastics Manufacturers, Belgium, **2017**.
- [9] Pardos Marketing, **n.d.**
- [10] V. Bhargava, in *Robust Plastic Product Design A Holistic Approach*, Hanser, **2018**, p. 44.
- [11] J. G. Speight, in *Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes*, Elsevier, **2011**, pp. 499–537.
- [12] L. W. McKeen, in *Fatigue and Tribological Properties of Plastics and Elastomers*, Elsevier, **2016**, pp. 45–64.
- [13] R. Geyer, J. R. Jambeck, K. L. Law, *Science Advances* **2017**, 3, e1700782.
- [14] Plastics Europe, *Plastics – the Facts 2018*, **2018**.
- [15] J. R. Jambeck, R. Geyer, C. Wilcox, T. R. Siegler, M. Perryman, A. Andrady, R. Narayan, K. L. Law, *Science* **2015**, 347, 768–771.
- [16] R. C. Thompson, *Science* **2004**, 304, 838–838.
- [17] A. Lusher, in *Marine Anthropogenic Litter*, Springer International Publishing, **2015**, pp. 185–200.
- [18] T. S. Galloway, M. Cole, C. Lewis, *Nature Ecology & Evolution* **2017**, 1, DOI 10.1038/s41559-017-0116.
- [19] E. Besseling, E. M. Foekema, J. A. Van Franeker, M. F. Leopold, S. Kühn, E. L. Bravo Rebolledo, E. Heße, L. Mielke, J. IJzer, P. Kamminga, et al., *Marine Pollution Bulletin* **2015**, 95, 248–252.
- [20] F. Amélineau, D. Bonnet, O. Heitz, V. Mortreux, A. M. A. Harding, N. Karnovsky, W. Walkusz, J. Fort, D. Grémillet, *Environmental Pollution* **2016**, 219, 1131–1139.
- [21] M. A. Browne, P. Crump, S. J. Niven, E. Teuten, A. Tonkin, T. Galloway, R. Thompson, *Environmental Science & Technology* **2011**, 45, 9175–9179.
- [22] E. R. Graham, J. T. Thompson, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **2009**, 368, 22–29.
- [23] M. Cole, P. K. Lindeque, E. Fileman, J. Clark, C. Lewis, C. Halsband, T. S. Galloway, *Environmental Science & Technology* **2016**, 50, 3239–3246.
- [24] N. M. Hall, K. L. E. Berry, L. Rintoul, M. O. Hoogenboom, *Marine Biology* **2015**, 162, 725–732.
- [25] *Plastic Facts 2014/2015*, Association Of Plastics Manufacturers, Belgium, **2015**.
- [26] M. Koller, A. Salerno, A. Muhr, R. Essl, A. Reiterer, G. Braunegg, *15th European Roundtable on Sustainable Consumption and Production (15th ERSCP)* **2012**, 14.
- [27] C. P. Rivero, Y. Hu, T. H. Kwan, C. Webb, C. Theodoropoulos, W. Daoud, C. S. K. Lin, in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, **2017**, pp. 1–26.
- [28] “Bioplastics – European Bioplastics e.V.,” can be found under <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>, **n.d.**

- [29] “bioplastics MAGAZINE 06-2016,” can be found under [https://issuu.com/bioplastics/docs/bioplasticsmagazine\\_1606\\_](https://issuu.com/bioplastics/docs/bioplasticsmagazine_1606_), **n.d.**
- [30] S. Selke, R. Auras, T. A. Nguyen, E. Castro Aguirre, R. Cheruvathur, Y. Liu, *Environmental Science & Technology* **2015**, 49, 3769–3777.
- [31] A. K. Mohanty, M. Misra, L. T. Drzal, *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*, Boca Raton, FL : Taylor & Francis, **2005**.
- [32] R. Smith, *Biodegradable Polymers for Industrial Applications - 1st Edition*, Woodhead Publishing, **2005**.
- [33] M. Belgacem, A. Gandini, *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resource*, Elsevier Science, **2008**.
- [34] L. Long, *Biodegradable Polymer Blends and Composites from Renewable Resources*, John Wiley & Sons, **2008**.
- [35] E. Rudnik, *Compostable Polymer Materials*, Elsevier, **2008**.
- [36] H. Liu, W. Song, F. Chen, L. Guo, J. Zhang, *Macromolecules* **2011**, 44, 1513–1522.
- [37] L.-T. Lim, R. Auras, M. Rubino, *Progress in Polymer Science* **2008**, 33, 820–852.
- [38] R. A. Auras, L.-T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji, *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*, WILEY, **2010**.
- [39] C. Bastioli, *Handbook of Biodegradable Polymers*, Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, U.K. : Rapra Technology, **2005**.
- [40] L. R. Krupp, W. J. Jewell, *Environmental Science & Technology* **1992**, 26, 193–198.
- [41] A. G. MAYER, *MEDUSAE OF THE WORLD, VOLUME III THE SCYPHOMEDUSAE, THE CARNEGIE INSTITUTION OF WASHINGTON*, WASHINGTON, D. C., **1910**.
- [42] F. Boero, *Review of Jellyfish Blooms in the Mediterranean and Black Sea*, Food And Agriculture Organization Of The United Nations, Rome, **2013**.
- [43] G. Hale, **n.d.**, 43.
- [44] M. N. Arai, *A Functional Biology of Scyphozoa*, **1997**.
- [45] N. M. H. Khong, F. M. Yusoff, B. Jamilah, M. Basri, I. Maznah, K. W. Chan, N. Armania, J. Nishikawa, *Food Chem* **2018**, 251, 41–50.
- [46] W. M. Hamner, *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* **1995**, 26, 101–118.
- [47] A. Schiariti, E. Christiansen, A. C. Morandini, F. L. da Silveira, D. A. Giberto, H. W. Mianzan, *Marine Biology Research* **2012**, 8, 255–264.
- [48] M. N. Arai, *Hydrobiologia* **2009**, 616, 241–246.
- [49] D. J. Hines, D. L. Kaplan, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **2013**, 30, 257–276.
- [50] C. D’Avila Carvalho Erbetta, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* **2012**, 03, 208–225.
- [51] K. Avgoustakis, *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* **2005**, 1–11.
- [52] X. S. Wu, N. Wang, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2001**, 12, 21–34.
- [53] A. T. C. R. Silva, B. C. O. Cardoso, M. E. S. R. e Silva, R. F. S. Freitas, R. G. Sousa, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* **2015**, 06, 8–19.
- [54] C. D. C. Erbetta, *Polímeros* **2011**, 21, 376–382.
- [55] D. Bendix, *Polymer Degradation and Stability* **1998**, 59, 129–135.
- [56] D. K. Gilding, A. M. Reed, *Polymer* **1979**, 20, 1459–1464.
- [57] J. Lunt, *Polymer Degradation and Stability* **1998**, 59, 145–152.
- [58] O. Dechy-Cabaret, B. Martin-Vaca, D. Bourissou, *Chemical Reviews* **2004**, 104, 6147–6176.
- [59] A. Merkli, C. Tabatabay, R. Gurny, J. Heller, *Progress in Polymer Science* **1998**, 23, 563–580.
- [60] A. Kowalski, A. Duda, S. Penczek, *Macromolecules* **2000**, 33, 7359–7370.
- [61] A. J. Domb, J. Kost, D. M. Wiseman, **1997**, 512.
- [62] Mj. Dorta, O. Munguía, M. Llabres, *International Journal of Pharmaceutics* **1993**, 100, 9–14.



- [63] M. Kl, **n.d.**, 9.
- [64] C. G. Pitt, G. Zhong-wei, *Journal of Controlled Release* **1987**, 4, 283–292.
- [65] J. M. Anderson, M. S. Shive, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, 28, 5–24.
- [66] F. Alexis, *Polymer International* **2005**, 54, 36–46.
- [67] M. Vert, *E-Polymers* **2005**, 8, 1–10.
- [68] S.-H. Hyon, K. Jamshidi, Y. Ikada, *Polymer International* **1998**, 46, 196–202.
- [69] C. Vinagre, M. J. Costa, J. A. Dunne, *Ecological Complexity* **n.d.**, 29, 87–92.
- [70] H. Cabral, M. J. Costa, *Environmental Biology of Fishes* **1999**, 56, 389–397.
- [71] B. Stuart, D. J. Ando, *Modern Infrared Spectroscopy*, Published On Behalf Of ACOL (University Of Greenwich) By Wiley, New York, **1996**.
- [72] R. Bauer, H. Nieuwoudt, F. F. Bauer, J. Kossman, K. R. Koch, null Esbensen Kim H, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 1371–1379.
- [73] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Fort Worth, Tex Saunders College Pub, **1992**.
- [74] “Wayback Machine,” can be found under [https://web.archive.org/web/20070216065646/http://las.perkinelmer.com/content/TechnicallyInfo/TCH\\_FTIRATR.pdf](https://web.archive.org/web/20070216065646/http://las.perkinelmer.com/content/TechnicallyInfo/TCH_FTIRATR.pdf), **2007**.
- [75] P. Haines, Ed. , *Principles of Thermal Analysis and Calorimetry*, Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2002**.
- [76] A. W. Coats, J. P. Redfern, *The Analyst* **1963**, 88, 906-.
- [77] W. M. Groenewoud, in *Characterisation of Polymers by Thermal Analysis*, Elsevier, **2001**, pp. 10–60.
- [78] T. R. Crompton, *Thermal Methods of Polymer Analysis*, Smithers Rapra Technology Ltd, Shawbury, Shrewsbury, **2013**.
- [79] G. A. Webb, A. E. Aliev, *Nuclear Magnetic Resonance: A Review of the Literature Published between June 2000 and May 2001*, The Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2002**.
- [80] C. S. Johnson, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1999**, 34, 203–256.
- [81] J. H. Simpson, in *NMR Case Studies*, Elsevier, **2017**, pp. 1–9.
- [82] J. Goldstein, D. E. Newbury, D. C. Joy, C. E. Lyman, P. Echlin, E. Lifshin, L. Sawyer, J. R. Michael, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: Third Edition*, Springer US, **2003**.
- [83] W. Zhou, Z. L. Wang, Eds. , *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*, Springer, New York, **2007**.
- [84] R. M. Glaeser, *Biophys J* **2012**, 103, 163–164.
- [85] J. Kong, S. Yu, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **2007**, 39, 549–559.
- [86] D. Shi, F. Liu, Z. Yu, B. Chang, H. D. Goff, F. Zhong, *Food Hydrocolloids* **2019**, 87, 436–447.
- [87] J. Zhu, X. Wang, C. He, H. Wang, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **2012**, 6, 63–73.
- [88] Y.-H. P. Hsieh, *Use of Jellyfish Collagen (Type II) in the Treatment of Rheumatoid Arthritis*, **2005**, US6894029B1.
- [89] V. Kumar, G. S. Banker, *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1993**, 19, 1–31.
- [90] R. Lindhardt, Springer-Verlag, New York, **1998**.
- [91] J. Garner, S. Skidmore, H. Park, K. Park, S. Choi, Y. Wang, *Int J Pharm* **2015**, 495, 87–92.
- [92] T. Nagai, T. Ogawa, T. Nakamura, T. Ito, H. Nakagawa, K. Fujiki, M. Nakao, T. Yano, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1999**, 79, 855–858.
- [93] S. Miura, S. Kimura, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 15352–15356.
- [94] P. Sivakumar, G. Chandrakasan, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1998**, 1381, 161–169.

## 7. Anexos

### 7.1. *Análise de Custos*

<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Preço por unidade, €</i>	<i>Custo, €</i>
<i>Glicolídeo</i>	55g	4,11	226,10
<i>D,L - Lactídeo</i>	100g	1,577	157,70
<i>Álcool laurílico</i>	100 ml	0,214	21,40
<i>Octanoato de estanho (II)</i>	100g	0,54	54,00
<i>Metanol Anidro</i>	4L	79	316,00
<i>Diclorometano</i>	1L	11,94	11,94
<b><i>Total</i></b>			<b>787,14</b>

Do total das 9 sínteses produzidas, segundo os rendimentos, foi obtido um total de 50g de PLGA. Sendo assim, cada grama de PLGA produzida neste trabalho teve um custo de 8,30€.

### 7.2. *Espectros de DSC das sínteses de PLGA*

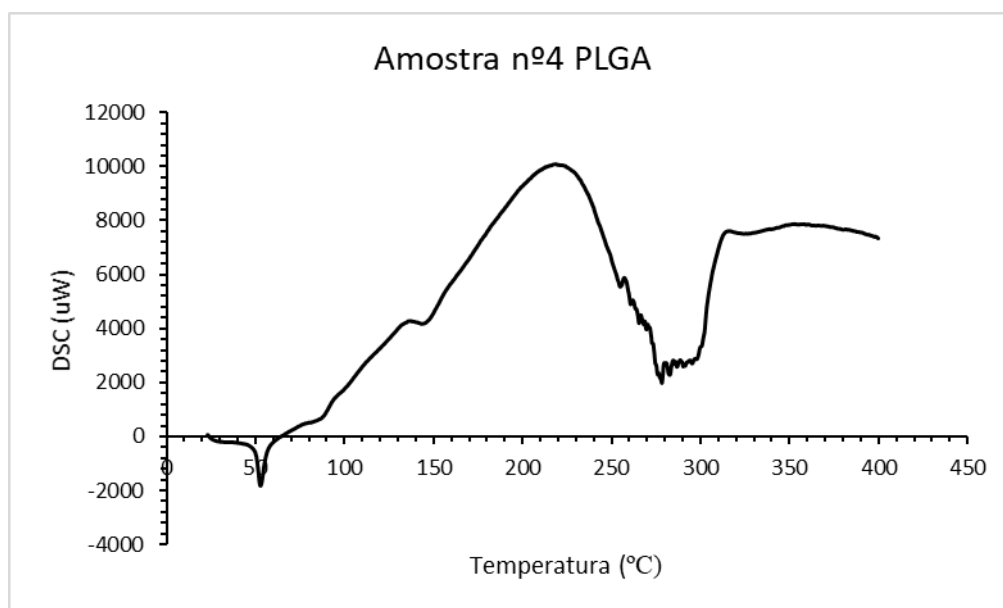


Ilustração 1: Espectro de DSC da síntese nº4 de PLGA.

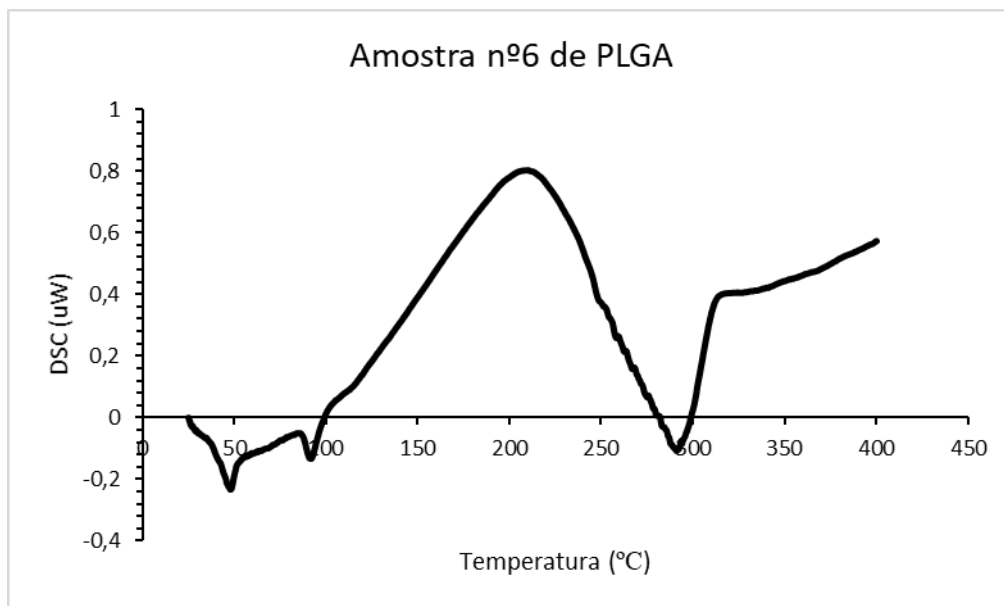


Ilustração 2: Espectro de DSC da síntese nº6 de PLGA.

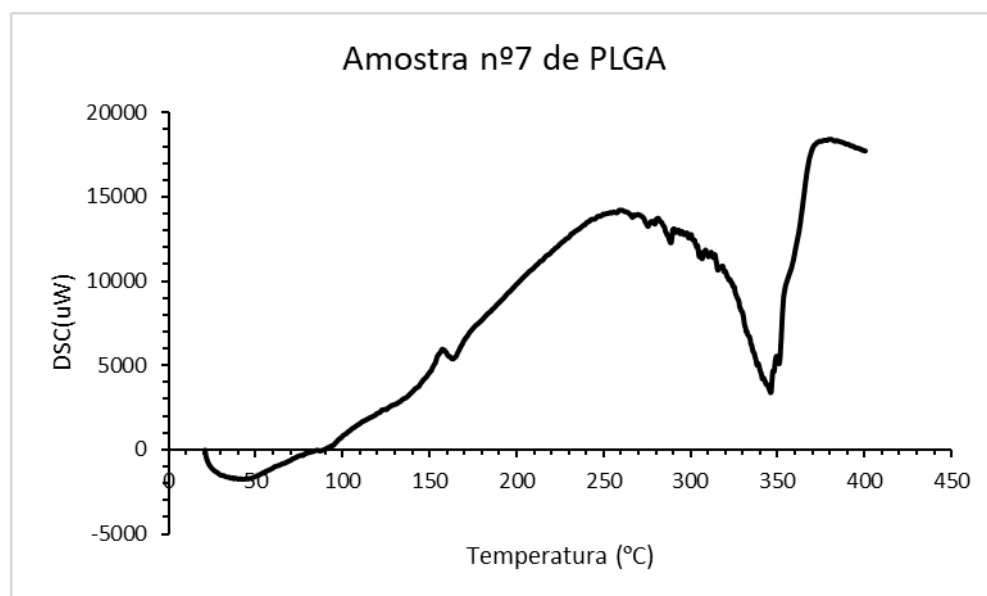
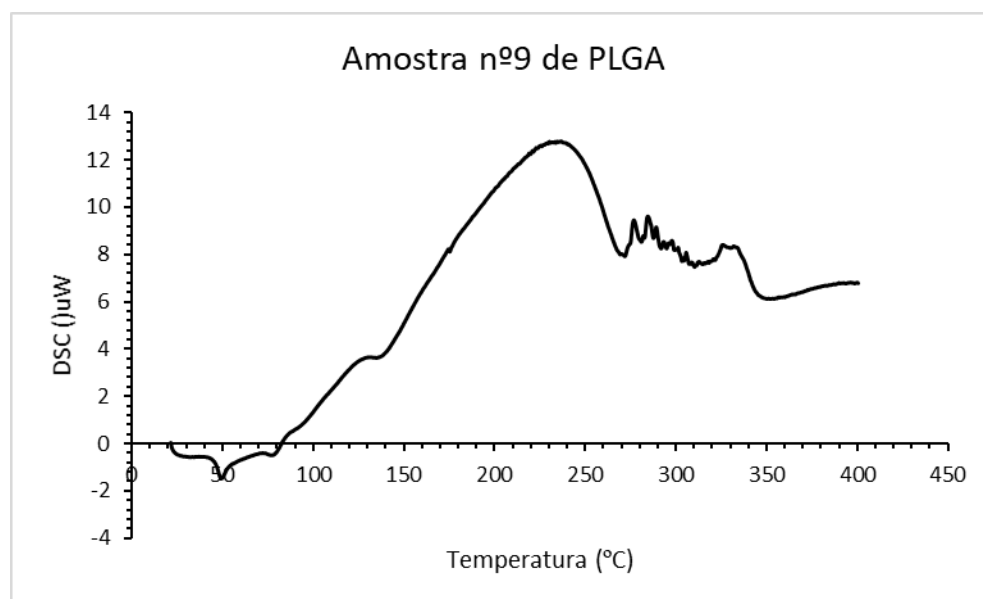


Ilustração 3: Espectro de DSC da síntese nº7 de PLGA.



*Ilustração 4: Espectro de DSC da síntese nº9 de PLGA.*

### 7.3. Espectros de TGA das sínteses de PLGA

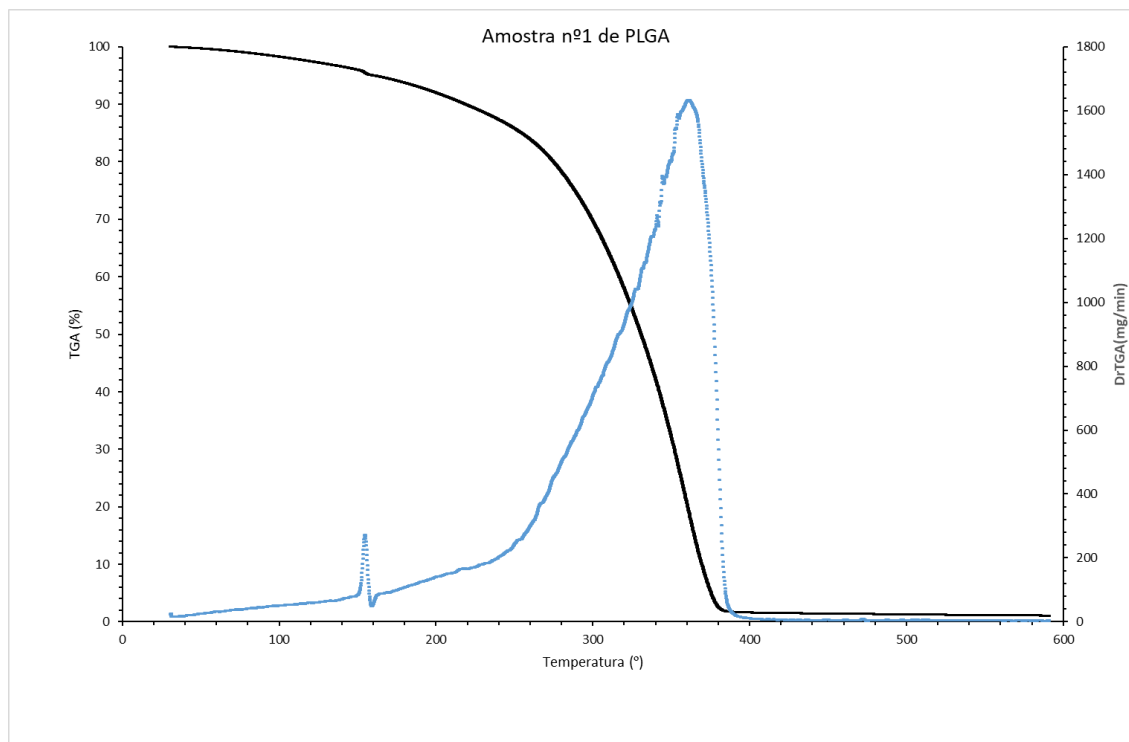


Ilustração 5: : Espectro de TGA e DTG da síntese nº1 de PLGA.

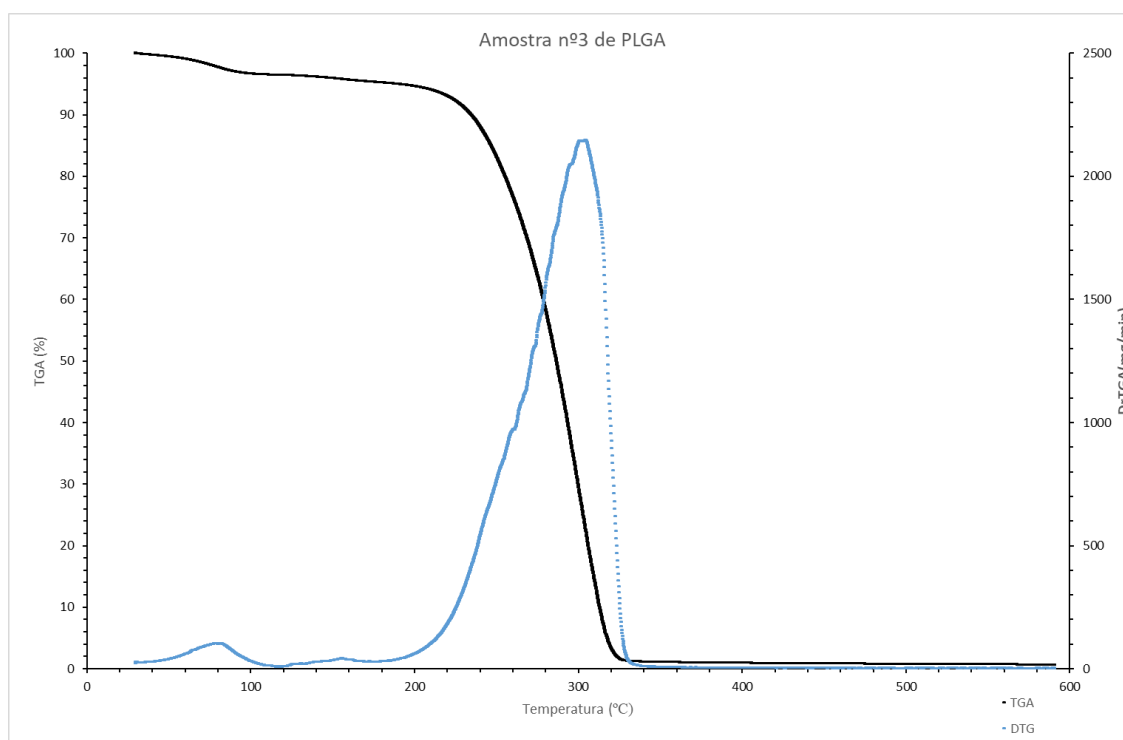
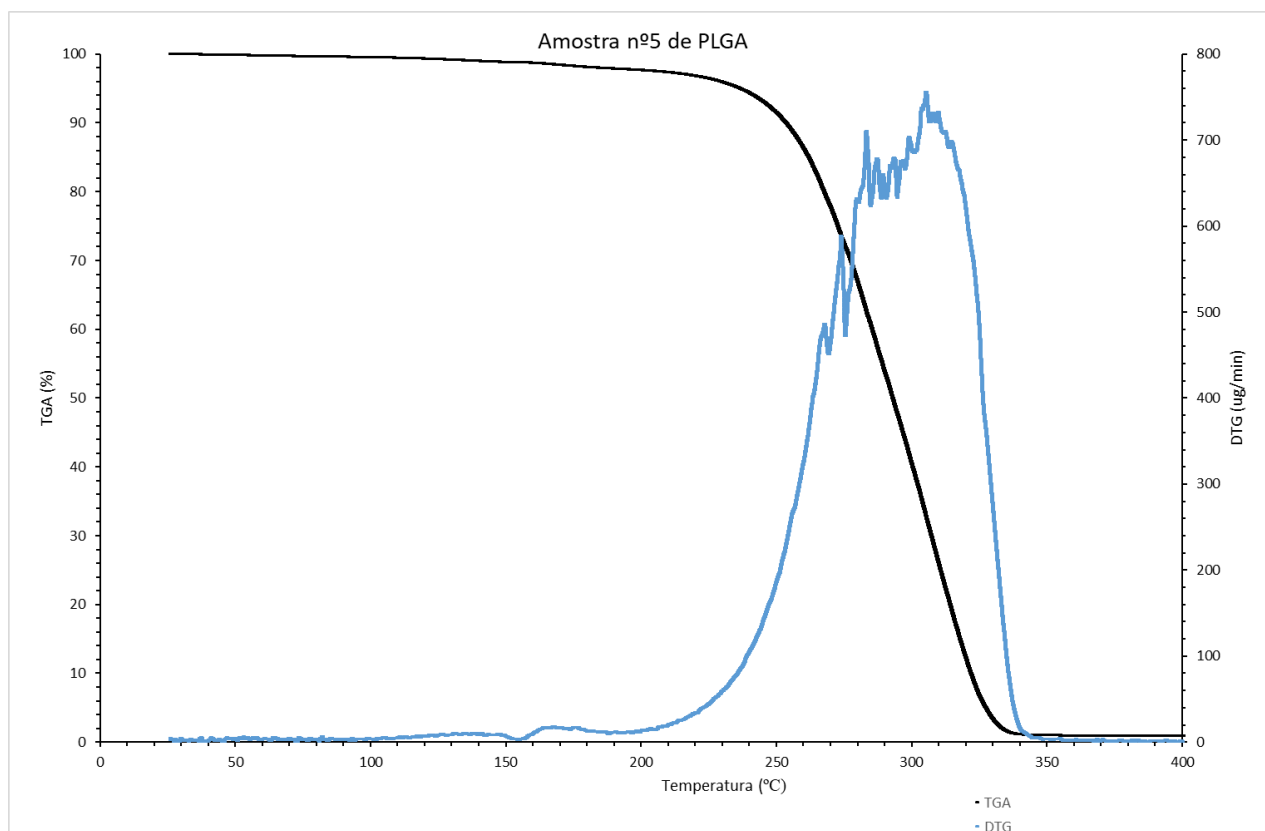
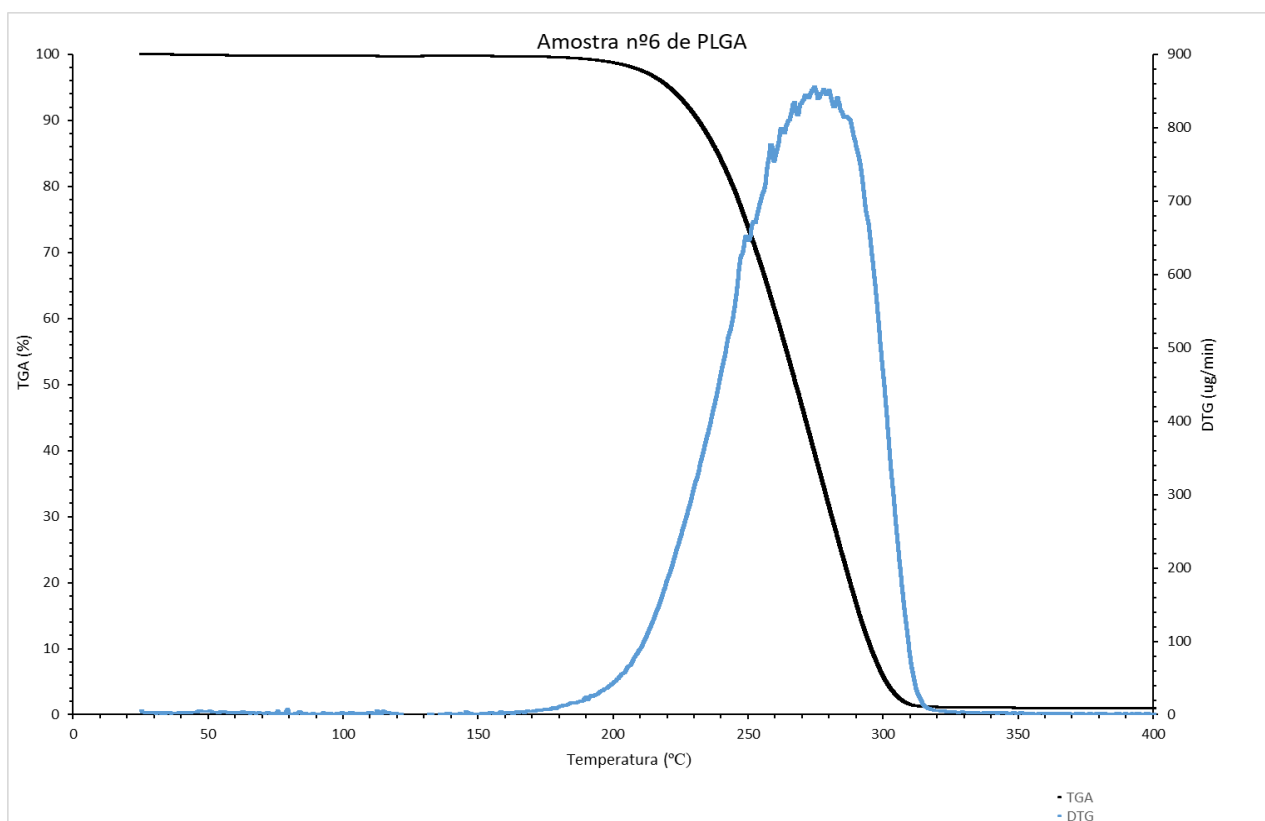


Ilustração 6: Espectro de TGA e DTG da síntese nº3 de PLGA.



*Ilustração 7: Espectro de TGA e DSC da síntese n°5 de PLGA.*



*Ilustração 8: Espectro de TGA e DTG da síntese n°6 de PLGA.*

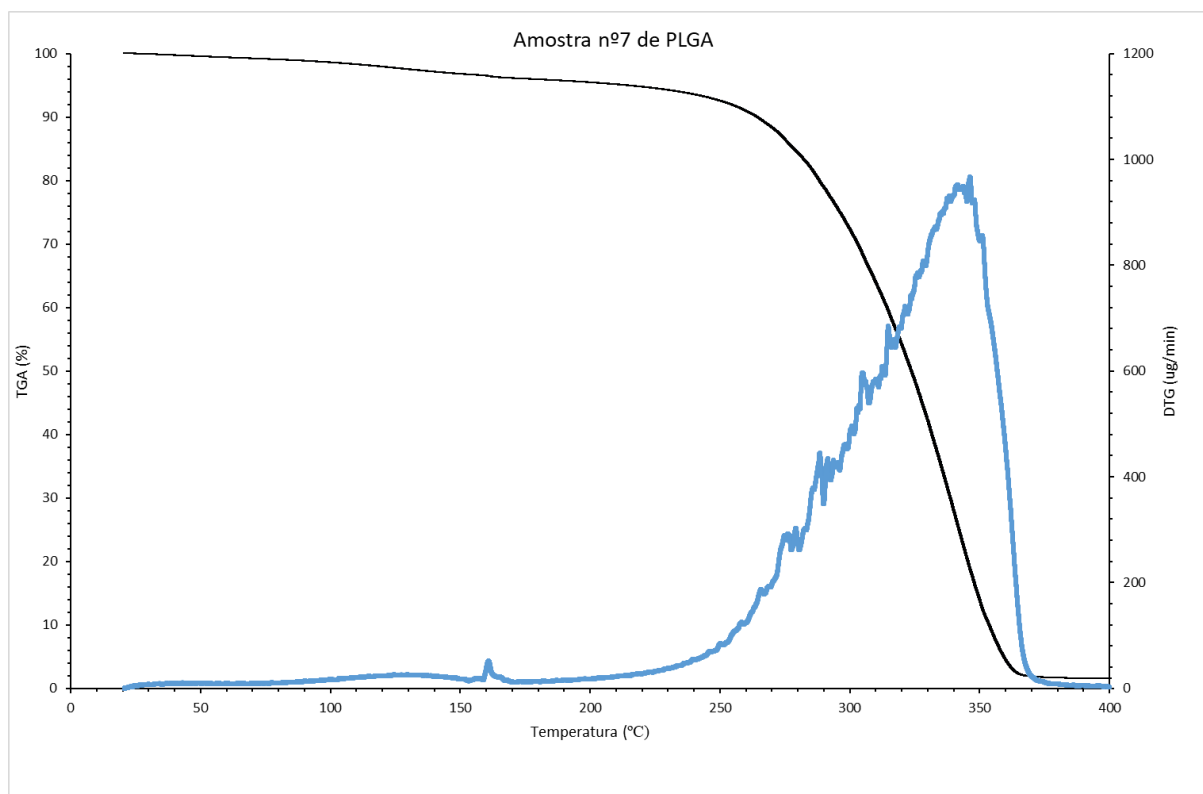


Ilustração 9: Espectro de TGA e DTG da síntese n°7 de PLGA.

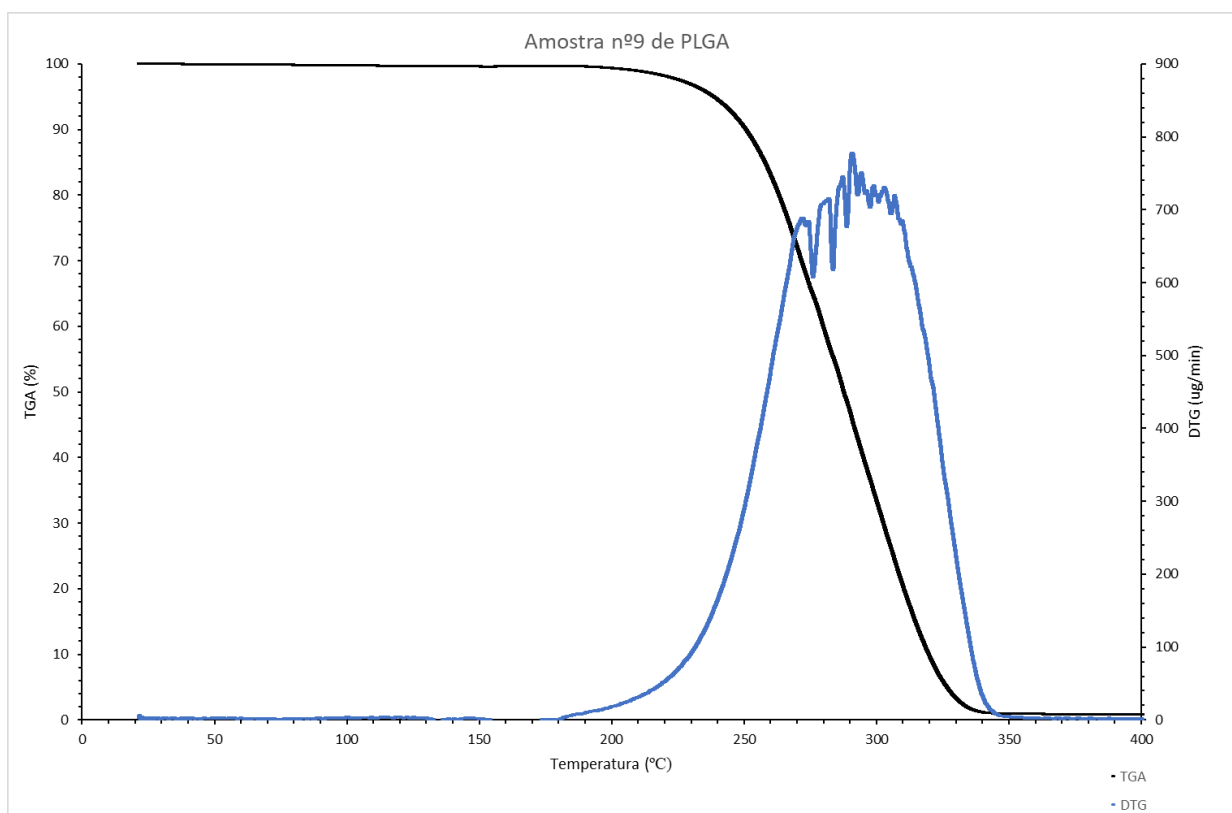


Ilustração 10: Espectro de TGA e DTG da síntese n°9 de PLGA.

#### 7.4. Espectro de NMR da síntese nº7 de PLGA

